



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO CLÍNICO, PATOLÓGICO Y
MOLECULAR DEL MELANOMA UVEAL Y
PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE SU
MICROAMBIENTE INFLAMATORIO

Montserrat Mora Cabezas

Sevilla, 2015

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han colaborado de alguna forma en la realización de esta Tesis Doctoral, y a las que quisiera expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, he de agradecer al Prof. D. Ricardo González Cámpora, director de esta Tesis, su confianza depositada en mí, así como su apoyo y motivación constantes que han sido necesarios para concluir este trabajo.

Al Dr. José Luis Villar Rodríguez, codirector de esta tesis, por su dedicación, entusiasmo y eficaz apoyo que han sido imprescindibles para lograr la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Ibáñez, M^a de Gracia Valero y Carolina de Roche por ayudarme en la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

Al Dr. Juan Polo por su gran ayuda en la realización del estudio estadístico y por su increíble amabilidad.

A la Dra. Ríos Moreno por su disponibilidad permanente y su profesionalidad.

A la Dra. Vallejo por su inestimable ayuda en la realización del estudio molecular.

A Juana Correa, por su inmejorable labor técnica, trabajo cuidadoso y estar siempre dispuesta a colaborar en todo.

Al Dr. Ríos Martín por su asesoramiento fotográfico y su constante disponibilidad.

A todos los adjuntos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen Macarena de Sevilla por todo lo que he aprendido gracias a ellos y continuo aprendiendo. De manera muy especial al Dr. García Escudero, por su innegable ayuda y demostrar a diario ser un compañero excepcional.

A M^a Dolores Montero por prestarme su ayuda siempre que se la pedí.

A la Dra. Scocco por su apoyo en los momentos felices y no tan felices. A Chelo García por su cariñoso apoyo diario.

Para finalizar, quiero mencionar a mi familia, mi mayor tesoro. A mis padres Diego y María por vuestro amor incondicional. A mis hermanos Anabel, Lolita, Jesús y en especial a mi hermana Auxi por estar siempre tan cerca de mí y darme tanto apoyo y energía positiva. A mis sobrinas Lucía y Marina por querer tanto a su tita Montse y recibirme siempre con una sonrisa. A mi cuarteto tecnológico (Juan, Germán, Alberto y Aquiles). Muchísimas gracias Juan por tu increíble amabilidad, paciencia, buen hacer y por hacer sonreír a mi hermana Anabel. A ti Germán gracias no sólo por tu contribución en esta tesis sino por todo lo que has hecho por mí en estos largos años.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI ABUELA ANA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TRACTO UVEAL	3
2.- MELANOMA UVEAL	12
2.1.- EPIDEMIOLOGÍA.....	12
2.2.- CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MELANOMA UVEAL	15
2.3.- CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL MELANOMA UVEAL:.....	25
2.4.- FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA UVEAL.....	35
2.5.- MACRÓFAGOS	75
2.6.- EL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO EN EL MELANOMA UVEAL.....	92
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	99
MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
1.- DATOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS.....	105
2.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	114
3.- PROCEDIMIENTO PARA LA DESPIGMENTACIÓN DE LAS SECCIONES HISTOLÓGICAS	122
3.1.- MÉTODO CON PERMANGANATO POTÁSICO	122
3.2.- MÉTODO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO DILUIDO	123
4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	129
4.1.- SISTEMA DE DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON FOSFATASA ALCALINA.....	129
4.2.- ANTICUERPOS.....	130
4.3.- PROTOCOLOS DE TINCIÓN.....	131
4.4.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	141

5.- ESTUDIO MOLECULAR.....	149
5.1.- PROTOCOLO DE FISH.....	150
5.2.- Sonda DNA-ESPECÍFICA	152
5.3.-VALORACIÓN DE RESULTADOS	152
6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	153
RESULTADOS.....	155
1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	157
1.1.- SEXO.....	157
1.2.- EDAD	157
1.3.- LATERALIDAD	157
1.4.- LOCALIZACIÓN	158
1.5.- TAMAÑO DEL TUMOR.....	160
1.6.- CATEGORÍA TUMORAL.....	160
1.7.- ESTADIO SEGÚN EL SISTEMA TNM.....	161
1.8.- EVOLUCIÓN CLÍNICA.....	162
2.- RASGOS HISTOPATOLÓGICOS	164
2.1.- TIPO HISTOLÓGICO.....	164
2.2.-PATRÓN DE CRECIMIENTO.....	166
2.3.- GRADO DE PIGMENTACIÓN.....	166
2.4.- NECROSIS.....	169
2.5.- ÍNDICE DE MITOSIS.....	169
2.6.- AFECTACIÓN DEL CUERPO CILIAR.....	169
2.7.- AFECTACIÓN ESCLERAL.....	171
2.8.- INVASIÓN VASCULAR.....	172
2.9.- INVASIÓN DEL NERVIO ÓPTICO	173

3.- RELACIÓN ENTRE EL TIPO HISTOLÓGICO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-MORFOLÓGICAS	174
3.1.- MELANOMA DE CÉLULAS FUSIFORMES.....	174
3.2.- MELANOMA DE CÉLULAS EPITELIOIDES	174
3.3.- MELANOMA DE CELULAS INTERMEDIAS	175
3.4.- MELANOMA DE TIPO MIXTO	175
4.- PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO	178
4.1.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD68.....	178
4.2.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD163.....	188
4.3.- COEXPRESIÓN DE ANTI-CD68/ANTI-CD163 Y EXPRESIÓN DE MARCADORES LINFOIDES	192
4.4.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-KI67	197
5.- ALTERACIÓN MOLECULAR: MONOSOMÍA 3.....	198
5.1.- MONOSOMÍA 3 Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	199
5.2.- MONOSOMÍA 3 Y TIPO HISTOLÓGICO	200
5.3.- MONOSOMÍA 3 Y OTROS RASGOS HISTOPATOLÓGICOS	201
5.4.- MONOSOMÍA 3 Y PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO	202
DISCUSIÓN	205
1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	207
2.- RASGOS HISTOPATOLÓGICOS	213
3.- PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO	226
4.- ALTERACIÓN MOLECULAR: MONOSOMÍA 3.....	234
5.- ASPECTOS METODOLÓGICOS	237

CONCLUSIONES.....	241
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	245
---------------------------	------------

ANEXOS.....	267
--------------------	------------

ANEXO 1: Protocolo de estudio clínico-patológico y molecular del melanoma uveal.....	269
---	-----

ANEXO 2: Tallado de la pieza de enucleación ocular por melanoma uveal...	277
---	-----

ANEXO 3: Protocolo de blanqueamiento de melanina para el recuento de mitosis en tumores pigmentados.....	289
---	-----

INTRODUCCIÓN

1.- ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TRACTO UVEAL

El tracto uveal o úvea es una capa vascular pigmentada que conforma la capa intermedia de las tres que constituyen el ojo. Consta del iris, el cuerpo ciliar y la coroides, que se hallan en continuidad entre sí (*Fig.1*). Está formada por numerosos vasos sanguíneos, un número variable de melanocitos, nervios y tejido conectivo de soporte.¹⁻³

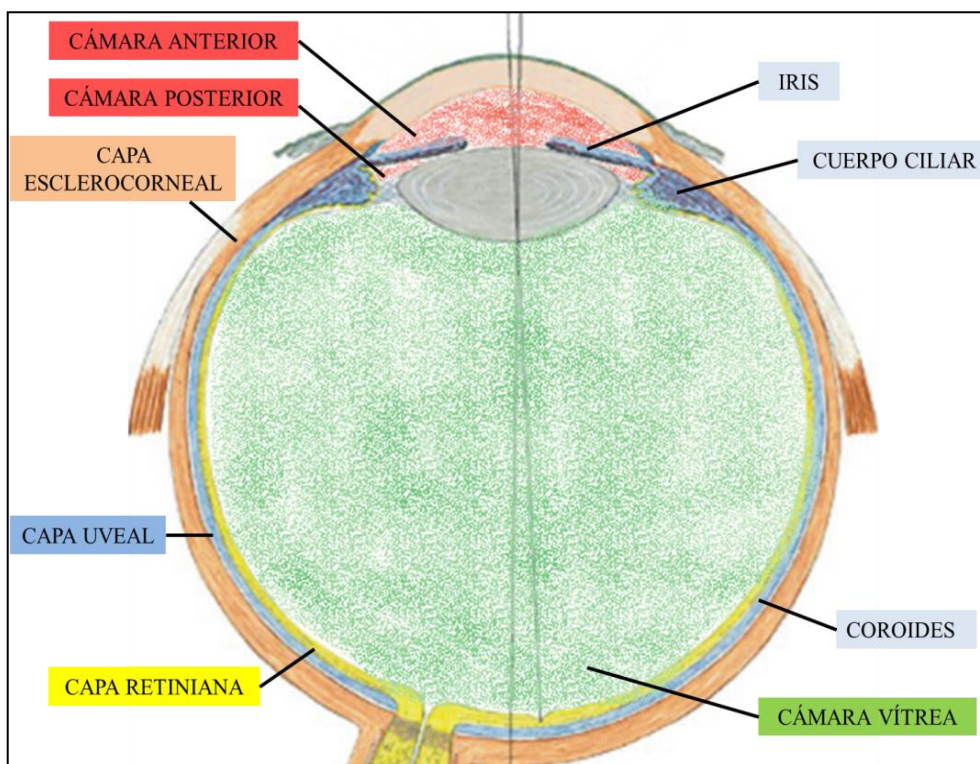


Figura 1. Capas y cámaras del globo ocular.

Aparte de las estructuras musculares especializadas del iris y del cuerpo ciliar, el tracto uveal se halla implicado en la nutrición del ojo, por medio de la secreción del humor acuoso por el epitelio del cuerpo ciliar, y en el mantenimiento de la retina externa por parte de la circulación coroidea.²

En el ojo hay tres grupos de células pigmentadas: 1) las células del epitelio pigmentado de la retina, cuerpo ciliar e iris; 2) los melanocitos conjuntivales, y 3) los melanocitos uveales, que se consideran las células de origen del melanoma de esta localización.¹

Los melanocitos de la úvea son células de forma dendrítica, variablemente pigmentadas, distribuidas en el estroma del iris, cuerpo ciliar y la coroides. Ocasionalmente pueden identificarse en los canales emisarios de la esclera e incluso en los tejidos episclerales. Los melanocitos, que derivan de la cresta neural, contienen melanina en los melanosomas y se hallan dispersos en todo el tracto; hay diferencias interindividuales e interraciales en su concentración relativa que explican el color del iris y el grado de pigmentación del fondo de ojo. En contraste, el epitelio pigmentado del iris, cuerpo ciliar y la retina derivan del neuroectodermo de la copa o cúpula óptica. La pigmentación aparece aquí (exceptuando la capa interna del epitelio ciliar, que permanece sin pigmento durante toda la vida) a las 6-8 semanas de gestación, mientras que la pigmentación del iris y de la coroides no se completa hasta los nueve meses de vida.³

Los gránulos de melanina grandes, esféricos u ovoides del epitelio pigmentado de origen neuroectodérmico (iris, cuerpo ciliar y retina) contrastan con los gránulos pequeños, uniformes y ovoides de los melanocitos uveales derivados, como se ha mencionado anteriormente, de las células de la cresta neural. Tal diferenciación en el tamaño, forma y grado de melanización, a veces, es útil para evaluar el origen de un tumor intraocular intensamente pigmentado.¹

Los tumores del epitelio pigmentado son denominados adenomas o carcinomas para diferenciarlos de los nevus y melanomas de origen melanocítico uveal.⁴

1.1.- COROIDES

La coroides es la estructura vascular y pigmentada que compone la capa media de la parte posterior del ojo (*Fig. 2*). Por la parte anterior se continúa, a través de la ora serrata (borde anterior festoneado de la retina fotosensible o límite entre la parte óptica

y ciega de la retina) en el cuerpo ciliar, mientras que por la parte posterior termina en el nervio óptico.^{4,5} Por la parte externa, la coroides está unida de forma laxa con la esclerótica, separadas por un espacio virtual, el espacio pericoroideo. Por la parte interna, la coroides está unida al epitelio pigmentado de la retina.⁵ Su espesor es máximo (0,25 mm) en el polo posterior y se va haciendo progresivamente más delgada en el polo anterior (0,10 mm).^{1,2,4}

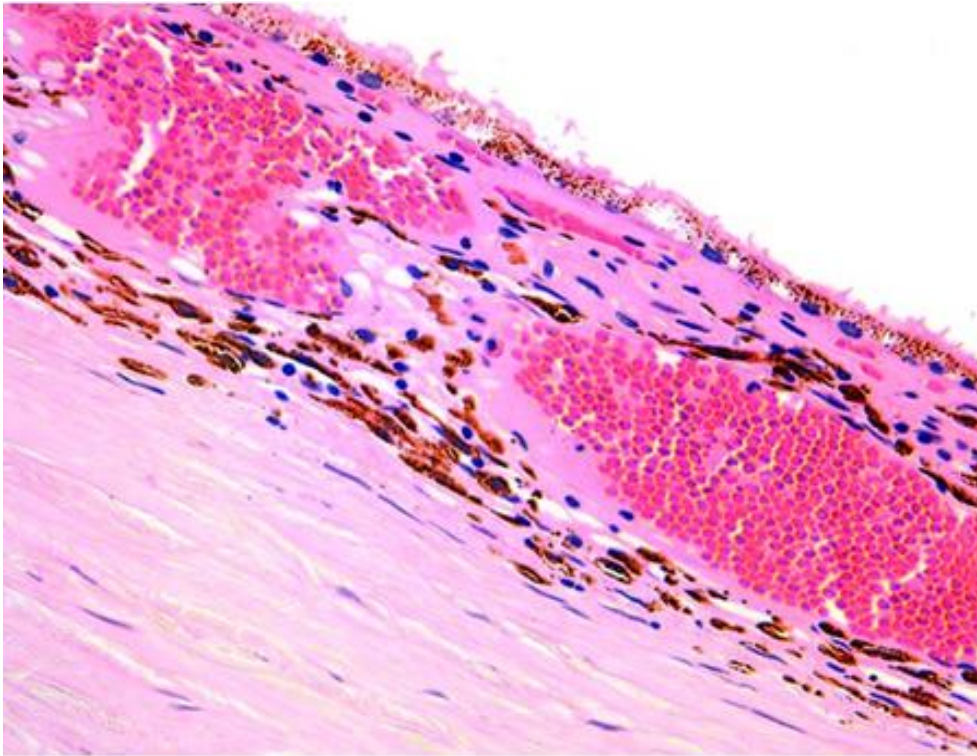


Figura 2. Coroides (HE, 40x).

Desde el punto de vista histológico, la coroides se divide en cuatro capas, denominadas desde la superficie externa a la interna como:^{1,4,5}

1ª) Lámina supracoroidea o epicoroidea (lámina fusca): Se compone de membranas planas agrupadas formadas por delgadas fibras de colágeno y elásticas. Las fibras conforman un reticulado laxo en el que se entretajan numerosos fibroblastos y melanocitos aplanados, con largas prolongaciones. La intensa pigmentación de la capa se debe al contenido de gránulos de melanina en los melanocitos.

2ª) Sustancia propia: Representa la masa principal de la coroides y contiene un denso reticulado de arteriolas, vénulas y pequeñas venas. El espacio entre los vasos de la sustancia propia está ocupado por un estroma de tejido conectivo laxo muy celular, con gran cantidad de melanocitos y macrófagos, que contienen melanina fagocitada. Por último aparecen linfocitos aislados, células plasmáticas y mastocitos.

3ª) Lámina coriocalilar: Se compone, sobre todo, de una red capilar densa, muy aplanada. Dicha red capilar irriga la parte periférica de la retina. Es la única capa de la coroides que no se continúa en el cuerpo ciliar, finaliza a la altura de la ora serrata. Las hendiduras entre los capilares están ocupadas por tejido conectivo que contiene delgadas fibras de colágeno y elásticas, para conferir rigidez a la red capilar.

4ª) Lámina basal o membrana de Bruch: Es una membrana de aproximadamente 3 µm de espesor, que separa la retina de la lámina coriocalilar. Se extiende desde el nervio óptico hasta la ora serrata, donde sufre modificaciones antes de continuar hacia el cuerpo ciliar. El microscopio electrónico demuestra que la membrana de Bruch no es una estructura homogénea, sino que consta de cinco capas diferentes:

- ❖ membrana basal del epitelio pigmentario de la retina,
- ❖ banda interna de colágeno,
- ❖ capa elástica,
- ❖ banda externa de colágeno y
- ❖ membrana basal del endotelio de los capilares de la capa coriocalilar.

1.2.- CUERPO CILIAR

El cuerpo ciliar se extiende posterolateralmente unos 6 mm desde la raíz del iris y el espolón escleral (proyección con forma de cresta de la superficie interna de la esclerótica a la altura del limbo esclerocorneal) hasta la ora serrata.⁶

En un corte sagital del globo ocular, el cuerpo ciliar tiene forma de triángulo, y cada uno de cuyos lados corresponde a una de sus tres caras. La cara externa, la única

adherente, se aplica a la interna de la esclerótica entre el paralelo de la ora serrata y el limbo esclerocorneal. La cara interna mira hacia el espacio retrocristaliniano del interior del ojo y la cara anterior mira hacia adelante y hacia el centro de la córnea, o sea, hacia el espacio precristaliniano (*Fig. 3A*).⁷ Está constituido por dos zonas: la pars plicata y la pars plana. La pars plicata o corona ciliar forma los 2 mm anteriores del cuerpo ciliar. Está compuesta por 60 a 70 pliegues, los procesos ciliares, cada uno de los cuales mide unos 0,8 mm de altura y 2 mm de ancho.^{2,4} En los procesos ciliares hay fibras elásticas dispersas y macrófagos con gránulos de pigmento melánico (*Fig.3B*).⁶ La pars plana u orbículo ciliar es la parte posterior aplanada del cuerpo ciliar, de aproximadamente 4 mm de longitud.⁴ Una de las funciones principales del cuerpo ciliar es la producción de humor acuoso, que tiene lugar, en su mayor parte, en la pars plicata.⁵

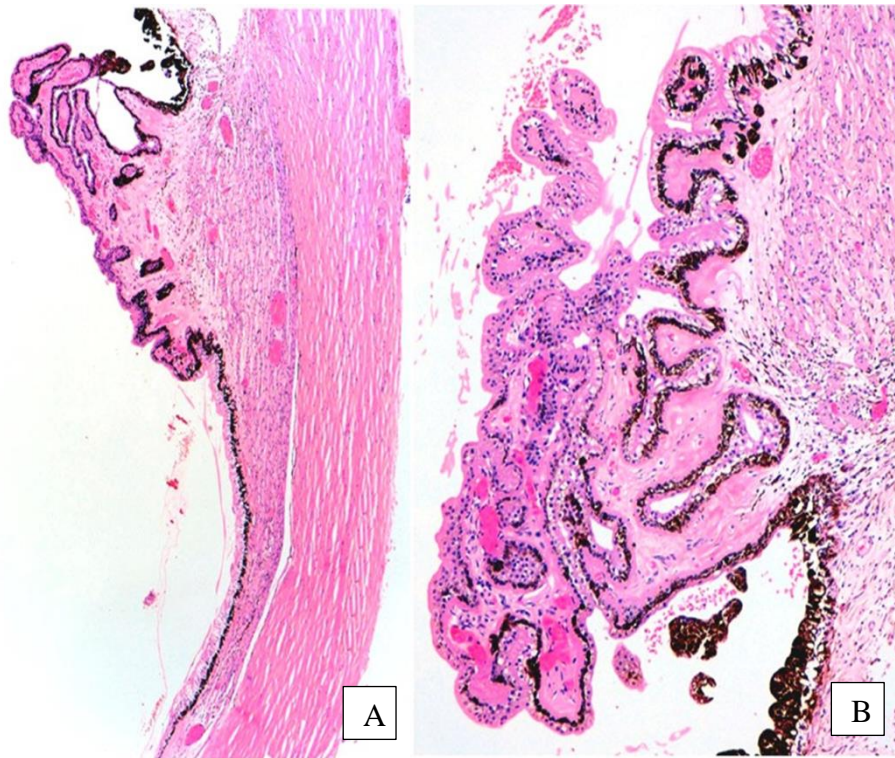


Figura 3. A) Cuerpo ciliar (HE, 4x); B) Procesos ciliares (HE, 10x).

Histológicamente en el cuerpo ciliar se distinguen siete capas:^{2,4,5}

1ª) Lámina supraciliar: Es la más externa y está constituida como la lámina supracoroidea. Representa una zona de transición entre el cuerpo ciliar y la esclerótica.

2ª) Músculo ciliar: Es el músculo de la acomodación del ojo. Está organizado en tres porciones o grupos funcionales de fibras musculares lisas:

- ❖ Fibras longitudinales (músculo de Brücke), que son las más externas, paralelas a la superficie de la esclerótica suprayacente y que constituyen la porción más abundante del músculo.
- ❖ Fibras circulares (músculo de Müller), que son la porción más interna.
- ❖ Fibras radiales, formadas por algunas fibras del músculo longitudinal, que discurren oblicuamente para continuarse con las fibras circulares.

3ª) Capa vascular: Es el estroma de tejido conectivo muy vascularizado del cuerpo ciliar. Por sus características corresponde a la sustancia propia de la coroides.

4ª) Lámina basal, membrana de Bruch o lámina vítrea: Representa la membrana basal del epitelio ciliar pigmentado. A la altura de la ora serrata las capas colágenas y elásticas de la membrana de Bruch, procedentes de la coroides, desaparecen en el estroma ciliar, continuándose dicha membrana de Bruch con la membrana basal del epitelio ciliar pigmentado.

5ª) Epitelio ciliar pigmentado: Es la capa más externa del epitelio ciliar, la cual constituye una extensión del epitelio pigmentado de la retina.³

6ª) Epitelio ciliar no pigmentado: Es la capa más interna del epitelio ciliar y representa la extensión anterior de la retina neurosensorial. A nivel de la raíz de iris, en esta capa celular aparecen cantidades crecientes de gránulos de melanina. En la ora serrata, la retina neurosensorial se atenúa y se vuelve quística, y se continúa con el epitelio no pigmentado interno del cuerpo ciliar. El epitelio pigmentado de la retina se continúa como la capa epitelial pigmentada de la pars plana.³

7ª) Membrana basal del epitelio ciliar no pigmentado: Es una malla compleja, a la cual se unen las fibras zonulares del cristalino.

1.3.- IRIS

El iris es la parte más anterior del tracto uveal. Nace del cuerpo ciliar y forma un diafragma por delante del cristalino, dividiendo el compartimento anterior del ojo en una cámara anterior y otra posterior, comunicadas a través de la pupila. El iris actúa como un diafragma ajustable que regula la cantidad de luz que llega a la retina.^{1,5,7}

El nombre de “iris” (del griego *iris* que significa arco iris) se debe a las variaciones de color que presenta, entre azul muy claro y pardo muy oscuro, debidas al diferente contenido de pigmento en el tejido conectivo del iris, como consecuencia de la variable cantidad de melanocitos.^{4,5,6}

El diámetro del iris es de unos 12 mm y el borde periférico o margen ciliar (raíz del iris) se fija a la superficie anteromedial del cuerpo ciliar. La raíz del iris es la parte más delgada de esta estructura (sólo unos 0,5 mm de espesor). El borde interno o margen pupilar es libre y descansa sobre la superficie anterior del cristalino.⁵

La superficie anterior del iris está dividida en dos zonas por una línea circular irregular, zigzagueante, el collar del iris o collarete. En la zona interna más angosta, la porción pupilar, se observan bandas de transcurso radial separadas por surcos, las criptas pupilares. La zona externa se denomina porción ciliar y presenta crestas radiales características producidas por vasos sanguíneos que recorren desde la periferia hacia el collar del iris, donde se anastomosan y forman el círculo arterial menor del iris, incompleto. Por fuera de las crestas radiales se distinguen criptas ciliares cerca de la raíz del iris. Además, en la superficie de la porción ciliar se observan varios pliegues de contracción concéntricos.^{2,5} La superficie posterior del iris es negra, debido a la pigmentación de la capa epitelial, y es bastante lisa (*Fig.4*).⁵

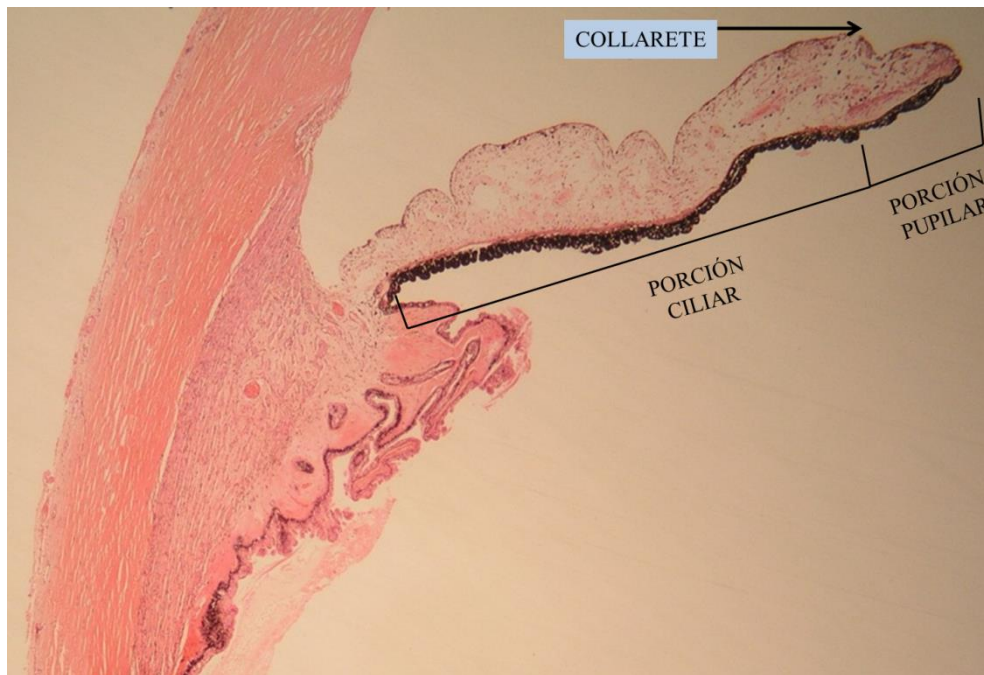


Figura 4. Iris (HE, 2x).

Desde el punto de vista histológico, el iris se compone de las siguientes capas (Fig.5):^{5,6}

1^a) Capa limitante anterior o lámina marginal anterior: Esta capa cubre la superficie anterior del iris, desde el margen pupilar hasta la raíz del iris. Se compone, en su mayor parte, de fibroblastos y melanocitos. Los fibroblastos forman una capa bastante continua de células aplanadas, con prolongaciones ramificadas. Justo por detrás de la capa de fibroblastos, los melanocitos constituyen una capa aplanada paralela a la superficie del iris.

2^a) Estroma del iris: Se compone de tejido conectivo laxo que contiene fibras de colágeno muy delgadas, separadas por sustancia fundamental, vasos sanguíneos y células. Las células son, sobre todo, fibroblastos y melanocitos, pero también se encuentran macrófagos con pigmento en su interior y mastocitos. Estudios con microscopía electrónica muestran dos tipos de grupos de células intensamente pigmentadas en el estroma iridiano: tipo I, que son macrófagos con melanina fagocitada; y tipo II, que son células neuroepiteliales con gránulos citoplásmicos de melanina y, probablemente, células del epitelio pigmentario que han emigrado al estroma. En la porción pupilar del iris el estroma presenta una banda circular de musculatura lisa, que

conforma el músculo del esfínter de la pupila cuya función es reducir el tamaño pupilar en respuesta a la luz intensa.

3ª) Epitelio anterior (músculo dilatador de la pupila): El epitelio anterior pigmentado está formado por una única capa de células mioepiteliales. Cada una de estas células se compone de una parte muscular basal (anterior), que conforma el músculo dilatador de la pupila, y una parte epitelial apical (posterior), que contiene el núcleo de la célula y posee abundantes gránulos de melanina en su citoplasma. Estos gránulos de pigmento contribuyen eficazmente a desdibujar los límites con las células epiteliales pigmentadas posteriores contiguas. Este epitelio está ausente en la región del músculo esfínter de la pupila. El músculo dilatador de la pupila tiene como efecto aumentar el diámetro pupilar y al igual que el músculo del esfínter de la pupila, tiene un origen neuroectodérmico.

4ª) Epitelio posterior: El epitelio posterior pigmentado del iris se compone de una única capa de células cilíndricas, cuyo citoplasma está ocupado en su totalidad por gránulos de melanina.

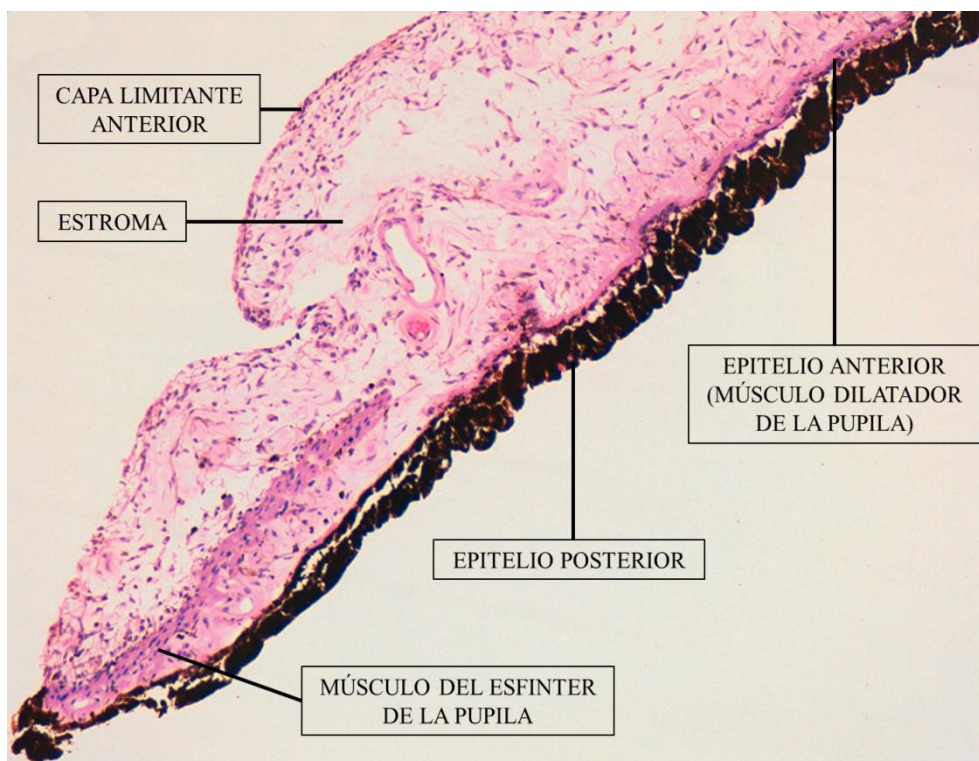


Figura 5. Capas del iris (HE, 10x).

2.- MELANOMA UVEAL

El melanoma uveal ha tenido una gran variedad de nombres descriptivos: melanosarcoma (para tumores de células fusiformes), melanocarcinoma (para tumores de células epitelioides), leucosarcoma (para los amelanóticos), angiosarcoma (para los tumores altamente vascularizados) y sarcoma de células gigantes (para tumores anaplásicos que contienen células gigantes bizarras, a menudo multinucleadas). En las últimas décadas, el término melanoma uveal ha ganado popularidad y es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualmente para designar un melanoma (entre ellos el uveal) no es necesario añadir la palabra maligno a la de melanoma. Es decir, a los tumores melanocíticos benignos se les debe llamar “nevus” y a los malignos “melanomas”.

Virchow (1863) reconoció que el melanoma es un tumor de melanocitos y que estos tumores no siempre están pigmentados. Tanto los tumores melanocíticos uveales benignos como los malignos muestran una gran variación en el grado de pigmentación: desde amelanóticos a tumores muy pigmentados.⁴

2.1- EPIDEMIOLOGÍA

El melanoma uveal es el tumor intraocular primario maligno más frecuente en adultos.⁸⁻¹² La incidencia anual estimada varía entre 4-7 casos por millón de habitantes en Estados Unidos^{13,14} a 5-10 casos por millón de habitantes en Europa,^{15,16} pero éstas podrían estar sobreestimadas, ya que algunos de estos estudios incluyen melanomas conjuntivales y del párpado.¹⁵ Al contrario que en el melanoma cutáneo, la incidencia del melanoma uveal se ha mantenido estable en las últimas tres décadas y no varía según la latitud.^{10,13,14}

El melanoma del tracto uveal generalmente se diagnostica en la sexta década de la vida, siendo la edad media de presentación alrededor de los 55 años en la mayoría de las series, observándose una incidencia mayor con el aumento de la edad.^{14,16-18} Este tumor es infrecuente en niños y adolescentes.¹⁹⁻²¹ En un estudio de 6358 pacientes con

melanoma uveal llevado a cabo por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFIP), el 1,6% de los melanomas se observaron en pacientes menores de 20 años.²² En un reciente estudio de 8967 pacientes con melanoma uveal realizado por Kiliki et al.,²⁰ 122 pacientes (1%) fueron igualmente menores de 20 años. El paciente más joven tenía tres años. El melanoma uveal congénito es extremadamente raro.²¹

Respecto al sexo, ambos están afectados de manera similar, con leve predominio por el sexo masculino,^{13,14,16,23-25} salvo en Israel y España, donde son ligeramente más frecuentes en mujeres.^{18,26-28}

La diferente incidencia del melanoma uveal en los distintos grupos raciales/étnicos se conoce desde hace tiempo. El melanoma uveal aparece con mucha menor frecuencia en pacientes de raza negra que en pacientes blancos.²⁵ Hu et al.²⁹ en 2005 publicaron que la incidencia anual ajustada a la edad (por millón de habitantes) del melanoma uveal era del 0,31 en pacientes de raza negra, 0,38 en pacientes asiáticos, 1,67 en pacientes hispanos, y 6,02 en pacientes blancos no hispanos. En definitiva, existe una correlación inversa entre el grado de pigmentación y la probabilidad de desarrollar un melanoma uveal.

La mortalidad debida al melanoma uveal se ha mantenido relativamente sin cambios en los últimos 50 años, a pesar de los avances en el diagnóstico y del tratamiento local efectivo.³⁰ Las metástasis ocurren por vía hematógica pero la extensión linfática del melanoma uveal es rara, probablemente debido a la ausencia de linfáticos intraoculares. Se han descrito casos de metástasis en ganglios linfáticos regionales después de la extensión local a la conjuntiva, donde el melanoma alcanza los vasos linfáticos. En estos casos el tumor se extendió a la conjuntiva a través de los canales emisarios o la malla trabecular. Lógicamente, los melanomas uveales localizados más anteriormente presentan mayor riesgo de alcanzar la conjuntiva y extenderse a los ganglios linfáticos regionales. Asimismo, los melanomas recurrentes tras la enucleación pueden invadir la conjuntiva que reviste la cavidad o implante orbitario y acceder a los linfáticos.³¹

La aparición de metástasis sigue constituyendo la principal causa de muerte en estos pacientes, siendo el hígado la localización más frecuente (90% de los casos).³²⁻³⁶

Otras localizaciones de metástasis incluyen el pulmón (24%), hueso (16%) y piel o tejido subcutáneo (11%), así como el páncreas, corazón, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal, riñones, cerebro, ovarios y tiroides. Estas metástasis extrahepáticas generalmente ocurren en asociación con las metástasis hepáticas.³³ Aunque el número de pacientes con sólo metástasis extrahepática es muy pequeño, su supervivencia media es de 18-24 meses.³⁵

Aproximadamente el 40% de los pacientes con melanoma uveal desarrolla metástasis hepáticas, que ocurren, como media, 10 años después del diagnóstico y tratamiento de la neoplasia primaria.^{34,35}

Se han descrito casos inusuales de melanomas uveales con metástasis clínicas más de 20 años después de la enucleación.³⁰ Sin embargo, la enfermedad metastásica clínicamente evidente en el momento de presentación inicial es infrecuente. Sólo un 1% de los pacientes tienen metástasis hepáticas clínicamente demostrables en el momento de la presentación,⁹ lo que sugiere la existencia de metástasis subclínicas precoces en la mayoría de los casos.³⁴ La supervivencia media de los pacientes con enfermedad metastásica hepática es de 4-5 meses con una supervivencia al año del 10-15%.^{32,36}

Los melanomas uveales rara vez son bilaterales; sin embargo, el número de pacientes con afectación bilateral es mayor de lo esperado sólo por azar, lo que implica una posible predisposición genética.¹⁰ En una gran serie de melanomas uveales publicada por Singh et al.,³⁷ ocho de 4500 pacientes presentaron melanoma bilateral. No se identificaron en estos pacientes síndrome específico, excepto la melanocitosis ocular en dos pacientes. Hadden et al.³⁸ identificaron cuatro pacientes con melanoma uveal bilateral en una serie de 1835 pacientes diagnosticados en el Centro Oncológico Ocular de Liverpool. Mutaciones de la línea germinal no identificadas podrían estar involucradas en la patogénesis del melanoma uveal bilateral.³⁷

2.2.- CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MELANOMA UVEAL

Las características macroscópicas a considerar son: localización del tumor, tamaño, patrón de crecimiento, grado de pigmentación y efectos sobre las estructuras adyacentes (tales como el desprendimiento de retina, la hemorragia vítrea o la distorsión pupilar, entre otros).⁴

El melanoma uveal afecta con mayor frecuencia a la coroides, en aproximadamente un 90% de los casos, seguido del cuerpo ciliar (7%) e iris (3%).^{9,35,39,40} Jensen,⁴⁰ en su revisión de melanomas malignos uveales en Dinamarca, concluyó que el 97% de todos los melanomas de la úvea afectaban a la coroides y al cuerpo ciliar, mientras que únicamente el 3% afectaban al iris. Shields et al.³⁹ en una revisión de 8800 pacientes con melanoma uveal, determinaron que 8631 (98%) se originaban en la coroides o cuerpo ciliar, mientras que sólo 169 (2%) lo hacían en el iris.

Aunque los oftalmólogos utilicen para determinar el tamaño del tumor tanto su extensión (diámetro o dimensión basal) como su espesor (altura o grosor), la mayoría de los patólogos emplean una clasificación más simplificada basada únicamente en la dimensión máxima tumoral. Atendiendo a ésta última, los melanomas uveales se dividen en tres grupos: pequeño, si la dimensión máxima tumoral es de 10 mm o menor; mediano, si la dimensión máxima es de 11 a 15 mm; y grande, si la dimensión máxima es mayor de 15 mm.^{1,41}

A pesar de que la mayoría de los melanomas uveales se presentan como una masa tumoral localizada (patrón de crecimiento focal), existen casos en los que el tumor crece infiltrando la úvea de un modo difuso sin producir apenas protusión y con bordes irregulares (patrón de crecimiento difuso).^{1,4,9}

El melanoma uveal muestra diferentes grados de pigmentación, desde amelanóticos hasta tumores muy pigmentados.^{1,4}

2.2.1.- MELANOMA DE COROIDES:

El melanoma de coroides suele exhibir un patrón de crecimiento bien focal o difuso;⁹ mientras que las lesiones multifocales son raras.¹ El patrón focal puede ser discoidal, cupuliforme, en forma de “cuello de botón o botón de camisa” o morfología en “champiñón o seta” (lo que equivale a los términos anglosajones “*button-collar*” o “*mushroom-shaped*”), bilobular, multilobular o francamente invasivo con extensión extraescleral y destrucción de los tejidos oculares (*Figs. 6-9*).⁹



Figura 6. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento focal y morfología discoidal.

Los tumores más pequeños son discoidales y limitados a la coroides. La fibrosa esclerótica previene la expansión externa del tumor pero internamente la membrana de Bruch es relativamente débil. Cuando estos tumores crecen y producen una masa discoidal mayor o cupuliforme, la membrana de Bruch se comprime por el tumor y finalmente se rompe (*Fig.10*).⁴ El mecanismo de esta ruptura se desconoce pero podría estar relacionado con el tamaño tumoral o la degradación enzimática.⁴² Inicialmente, el tumor se hernia a través de la ruptura y crece dentro del espacio subretiniano,

adquiriendo una configuración “en cuello de botón”. El crecimiento en este espacio suele ser mayor que en la coroides y cuando la masa en el espacio subretiniano llega a hacerse más grande, el tumor adquiere una forma en “champiñón o seta”.^{4,41,43,44} Esta particular configuración es altamente característica pero no patognomónica del melanoma corioideo.⁴³ La enfermedad de la membrana de Bruch no influye en la diferenciación del melanoma corioideo hacia patrones de crecimiento cupuliforme o en forma de champiñón.⁴² La retina suprayacente al melanoma uveal puede presentar atrofia, degeneración quística, focos de hemorragia e incluso infiltración por el tumor (*Fig. 11*) mientras que la retina que rodea al tumor se desprende por la acumulación de exudado seroso entre la retina y el epitelio pigmentado de la retina.⁴ En algunos casos, el fluido subretiniano es sanguinolento, casi exclusivamente en ojos que presentan erupción del tumor a través de la membrana de Bruch.⁴³ El desprendimiento total de la retina se puede observar, especialmente en tumores grandes.¹ Cuando los tumores llegan incluso a ser mayores, invaden y destruyen los tejidos oculares, ocupando finalmente el globo ocular en su totalidad.^{4,39}



Figura 7. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento focal y morfología cupuliforme.

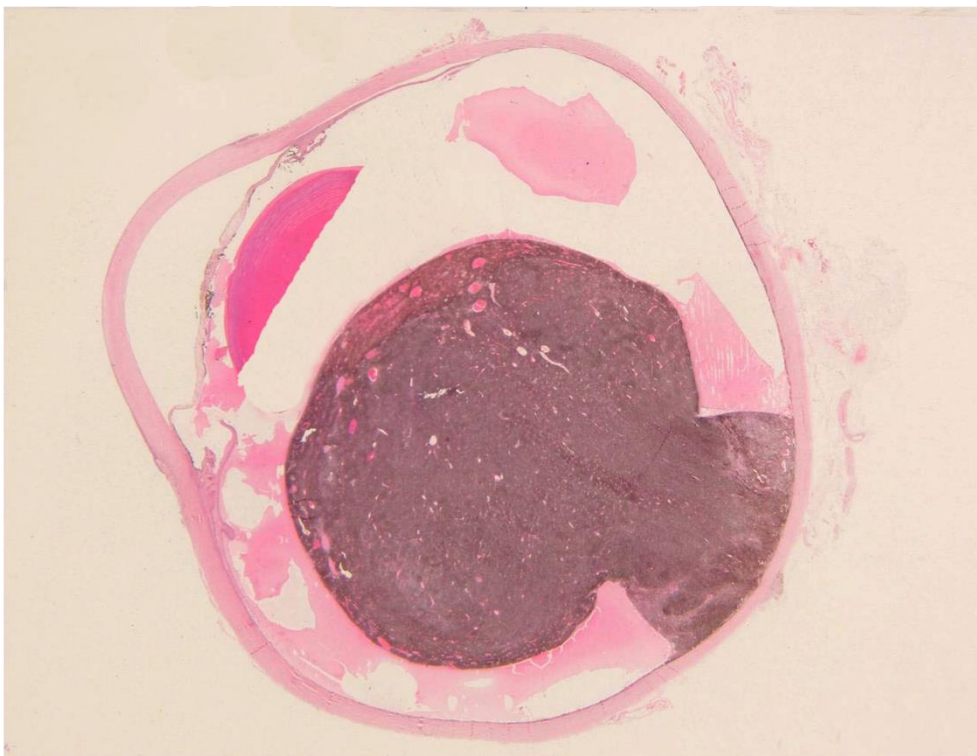


Figura 8. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento focal y morfología “en champiñón” (HE).

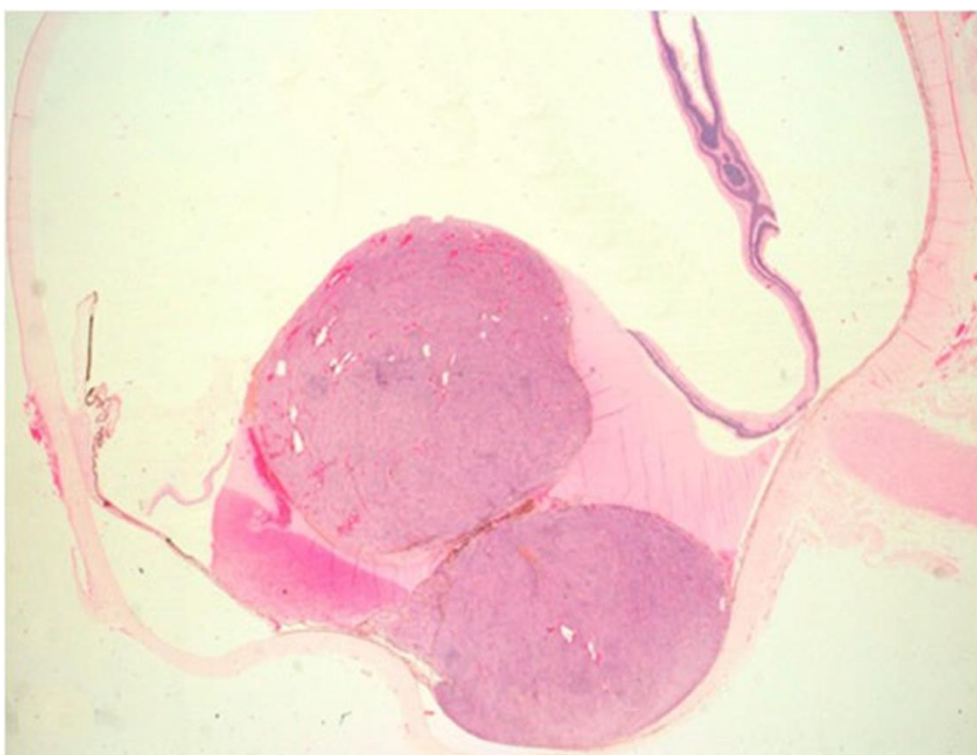


Figura 9. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento focal y morfología bilobulada (HE).

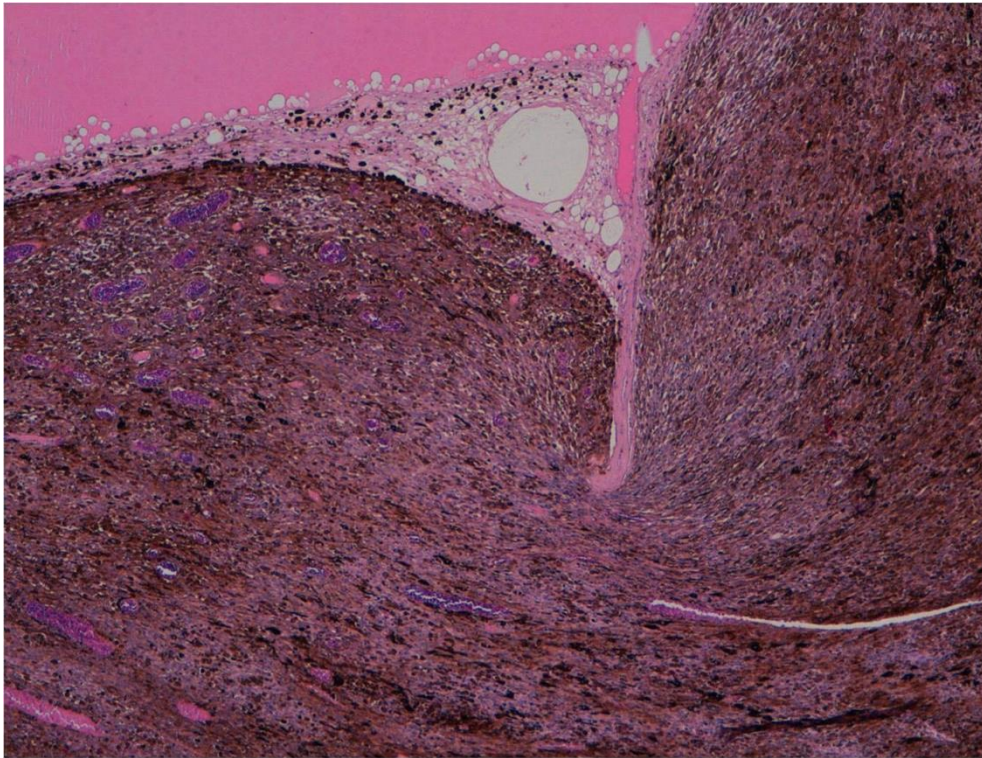


Figura 10. Herniación del melanoma de coroides a través de la ruptura de la membrana de Bruch (HE, 4x).

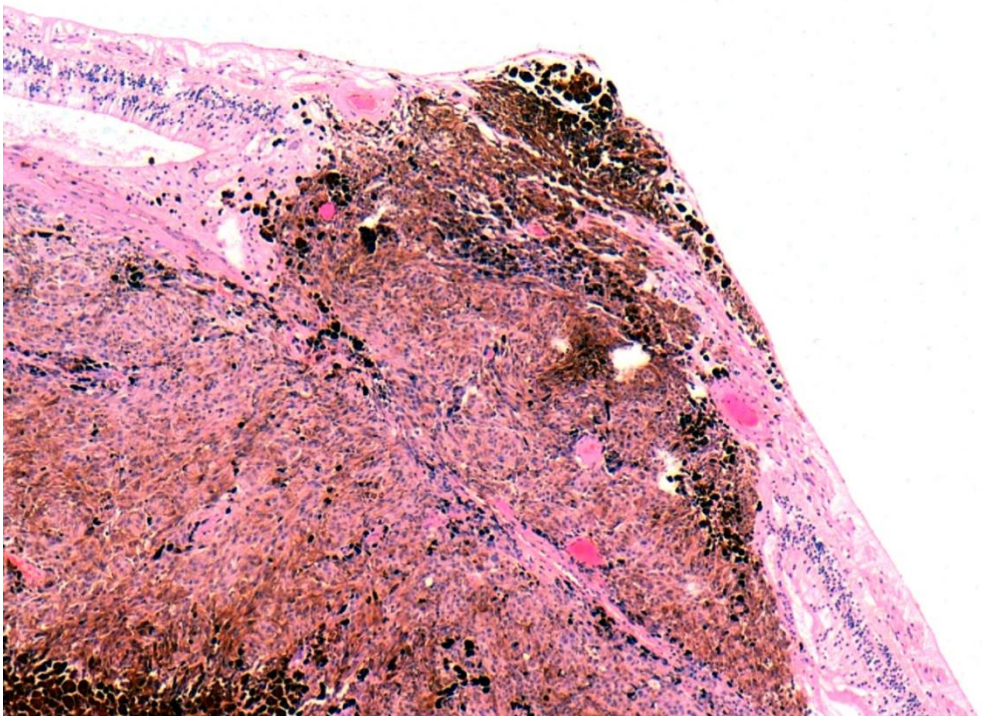


Figura 11. Infiltración de la retina por melanoma de coroides (HE, 10x).

Algunos tumores infiltran por vía posterior a través de la esclera, generalmente a lo largo del trayecto de los nervios perforantes o vasos hacia el interior de la órbita, o por vía anterior hacia la conjuntiva.⁴ La ruptura de la esclera como resultado de la invasión directa es rara. La invasión del nervio óptico se observa en menos del 10% de los ojos enucleados, y generalmente se asocia con el tamaño tumoral grande, la localización peripapilar y una presión intraocular elevada.¹

El melanoma uveal difuso se define como el tumor uveal primario que muestra un patrón de crecimiento plano y cuyo espesor es igual o inferior al 20% de la dimensión basal máxima.^{9,45} Otros autores consideran como patrón de crecimiento difuso cuando el tumor afecta al menos un cuarto de la úvea observable en el plano de corte y son menores de 7 mm de espesor máximo (*Fig.12*).⁴² Font y posteriormente Shields et al.^{45,46} publicaron que el 3-5 % de los melanomas uveales incluidos en sus estudios eran de tipo difuso.

La definición del melanoma coroideo difuso varía según los autores, pero en general, es un melanoma coroideo primario con un patrón de crecimiento plano o mínimamente elevado y presenta una gran base en relación con su espesor.^{4,9,45,47,48} La definición ha variado poco desde las primeras publicaciones de melanoma coroideo difuso por Fuchs en 1882 y Mitvalsky en 1894. Parsons definió estos tumores como aquellos que infiltran amplias áreas de la úvea, produciendo un engrosamiento uniforme sin la formación de un tumor definido. Empleó la descripción francesa de “sarcome en nappe ou en plaque” (en inglés “*sarcoma in sheet or in plateau*”).⁴⁹

El melanoma coroideo difuso es una variante agresiva poco frecuente de melanoma de coroides.^{11,41,47,48} Representa el 4-5% de todos los melanomas uveales posteriores.^{46,50} Sus bordes son irregulares con prolongaciones en forma de lengüeta que le dan aspecto de carta geográfica y puede abarcar incluso la totalidad de la coroides permaneciendo intacta la membrana de Bruch.⁴⁷ Son más propensos a infiltrar a través de la esclera que los melanomas uveales discoidales y pueden producir una masa orbitaria mayor que el tumor intraocular.^{4,41} Dhupper et al.⁵¹ (2012) en su serie de 113 pacientes con melanoma de coroides encontraron el patrón difuso en cinco pacientes (4,4%), y en los tres pacientes que presentaban extensión orbitaria. A diferencia del tipo

focal, el difuso tiene tendencia a invadir la cabeza del nervio óptico y extenderse posteriormente hacia la porción retrolaminar del mismo.¹

En los melanomas coroideos pueden aparecer varios grados de pigmentación; algunos son intensamente pigmentados, otros son mínimamente pigmentados y otros parcialmente pigmentados.^{11,43} Este grado de pigmentación altamente variable no se relaciona con el tipo celular.¹ Un melanoma amelanótico debe ser diferenciado de otras lesiones simuladoras.¹¹ Los melanomas coroideos intensamente melanóticos y pequeños exhiben en su superficie un pigmento naranja, que corresponde a gránulos de lipofucsina y se asocian con fluido subretiniano.^{11,43,52} La presencia de este pigmento naranja en los nevus coroideos es un predictor de transformación maligna.⁵³



Figura 12. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento difuso.

2.2.2.- MELANOMA DEL CUERPO CILIAR

Los melanomas del cuerpo ciliar son menos frecuentes, más pequeños y tienen una forma más esférica que los tumores coroideos. La membrana de Bruch no existe como tal en el cuerpo ciliar (recordemos que a la altura de la ora serrata sufre modificaciones, desapareciendo las capas colágenas y elásticas procedentes de la

coroides), así el epitelio ciliar no proporciona un efecto barrera al crecimiento tumoral.¹ Estos tumores pueden extenderse con frecuencia hacia la cámara posterior y originar una catarata o subluxación del cristalino, también pueden extenderse hacia el ángulo de la cámara anterior e iris (melanoma iridociliar), o posteriormente hacia la coroides (melanoma ciliocoroideo, *Fig.13*).^{10,11} Más frecuentemente, el cuerpo ciliar se afecta por el crecimiento progresivo de melanomas que surgen en la coroides. Estos tumores deben considerarse tumores coroides en cuanto al pronóstico y tratamiento.¹



Figura 13. *Melanoma ciliocoroideo.*

El melanoma de tipo difuso también ocurre en el cuerpo ciliar donde el tumor tiende a crecer en una configuración “en anillo”.⁵⁴ Como los melanomas difusos de la coroides, estos tumores tienen gran tendencia a extenderse extraescleralmente. La extensión extraocular ocurre generalmente a lo largo de los canales de salida del acuoso desde las mallas trabeculares y el canal de Schlemm.^{1,55} Esta extensión puede confundirse con un melanoma primario de la conjuntiva.¹

El término “melanoma en anillo” (que equivale al término anglosajón “*ring melanoma*”) fue utilizado por primera vez por Ewetzky en 1898 para describir un patrón de crecimiento inusual de melanoma uveal en el que el tumor se extendía circunferencialmente, afectando la totalidad del cuerpo ciliar e iris. Posteriormente, este término se adaptó para indicar la orientación circunferencial del crecimiento del melanoma en el ojo en general.⁵⁶ Parsons especuló que este patrón de crecimiento representaba una variante del melanoma uveal difuso.⁴⁹ Sólo una pequeña proporción de melanomas uveales difusos son tumores en anillo.⁵⁷

El melanoma en anillo es una variante rara de melanoma uveal (constituye aproximadamente el 0,3% de todos los melanomas uveales), que se caracteriza por un patrón de crecimiento circunferencial alrededor del ojo.^{56,58} Clásicamente, debería afectar a los tejidos uveales en un anillo completo pero en la práctica, el melanoma en anillo rara vez infiltra el tracto uveal tan extensamente. Actualmente, este término se aplica al melanoma que afecte circunferencialmente a la úvea en al menos 180°.⁵⁶ Puede presentarse en la coroides, cuerpo ciliar, iris y ángulo de la cámara anterior (ángulo formado por el iris y la zona de transición esclerocorneal), pero el cuerpo ciliar es su principal localización.^{56,57,59,60} No obstante, el anillo puede surgir de la coalescencia de tumores que surgen de varias localizaciones.⁶⁰

El melanoma en anillo del ángulo de la cámara anterior es un subtipo raro de melanoma uveal anterior difuso, representando sólo el 0,2% de todos los melanomas uveales. Se manifiesta como un crecimiento tumoral plano, circunferencial limitado a la malla trabecular y otras estructuras del ángulo de la cámara anterior, siendo su pronóstico relativamente malo. Según Demerci et al.⁵⁹ los criterios específicos para clasificar un melanoma como del ángulo de la cámara anterior son: 1) melanoma ocular primario confirmado histológicamente; 2) afectación tumoral predominante en la malla trabecular y otras estructuras del ángulo de la cámara anterior; 3) ausencia de nódulo tumoral en el iris o cuerpo ciliar en el examen clínico; y 4) ausencia de cualquier otra afectación uveal.

No existe una buena explicación del por qué algunos melanomas uveales posteriores crecen difusamente en un patrón en anillo mientras que la mayoría de ellos crecen como nódulos delimitados. En el cuerpo ciliar, según algunos autores, el patrón de crecimiento tumoral difuso en anillo se atribuye a la infiltración facilitada de las células tumorales a través del canal de Schlemm, de la malla trabecular, y del círculo arterial mayor del iris.⁶¹ Sin embargo, en la coroides no existen estructuras anatómicas comparables orientadas circunferencialmente que expliquen el crecimiento anular de un melanoma uveal difuso en este tejido.⁵⁷

La mayoría de los melanomas del cuerpo ciliar aparecen clínicamente pigmentados; sin embargo, los cortes macroscópicos oscilan desde profundamente pigmentados hasta amelanóticos; por otro lado, muchos de los tumores amelanóticos aparecen pigmentados clínicamente porque el epitelio ciliar pigmentado suprayacente proporciona una apariencia oscura a la superficie de la lesión.¹

2.2.3.- MELANOMA DEL IRIS

El melanoma del iris muestra dos patrones de crecimiento: circunscrito y difuso. La mayoría de los melanomas de iris de tipo circunscrito se presentan como una masa bien delimitada, a veces de bordes irregulares, de color amarillo, beige o marrón con un contorno anterior plano o redondeado.^{43,62,63} Existe una marcada tendencia del melanoma circunscrito a localizarse en la porción inferior del iris, encontrándose en esta localización más del 80% de estos tumores.^{10,11,62}

El melanoma del iris difuso es una variante infrecuente de melanoma uveal anterior que representa aproximadamente el 10% de todos los melanomas del iris.⁶⁴ Muestra un patrón de crecimiento mal definido, plano e infiltrativo con afectación del iris multifocal o confluyente (*Fig.14*). Según Demerci et al.⁶³ los criterios específicos para clasificar un tumor como melanoma del iris difuso incluyen: 1) melanoma uveal primario; 2) con patrón de crecimiento plano en el iris; 3) con una extensión circunferencial de más de 6 horas de reloj; y 4) sin nódulo tumoral definido en el iris, cuerpo ciliar, u otra localización en el ojo afecto.

Ambos tipos de melanomas del iris, circunscritos y difusos, presentan un amplio rango de pigmentación tanto clínica como histopatológicamente. El melanoma “en tapioca” es un raro tumor amelanótico del iris que se presenta como múltiples nódulos de aspecto gelatinoso.^{1,10,11,65}



Figura 14. Melanoma de iris con patrón de crecimiento difuso (flecha) que muestra extensión extraescleral (asterisco).

2.3.- CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL MELANOMA UVEAL

El examen histopatológico del melanoma uveal debe comenzar con la determinación del tipo celular.⁶⁵ En 1931, Callender⁶⁶ propuso una clasificación de los melanomas uveales basada en los hallazgos citológicos e histopatológicos. Dividió las células del melanoma uveal en dos tipos citológicos principales: fusiforme y epitelioides.

Las células fusiformes son de morfología alargada y están generalmente dispuestas en haces estrechamente cohesivos. Los límites celulares son indistinguibles, dando el aspecto de un sincitio. El citoplasma tiene un carácter fibrilar o finamente granular. Callender identificó dos tipos de células fusiformes basándose en las características nucleares:

- ❖ El subtipo A tiene un núcleo delgado con cromatina fina y nucléolo indistinguible; a menudo existe un pliegue o “hendidura” longitudinal en la envoltura nuclear, que da la apariencia de una “cromatina rayada”. Este pliegue, causado por la invaginación de la membrana nuclear, es característico de este tipo celular aunque no siempre es evidente.⁶⁷
- ❖ El subtipo B tiene un núcleo más grande, cromatina más grosera y un nucléolo eosinófilo más prominente.⁶⁶

La actividad mitótica es muy rara en las células de tipo fusiforme A e infrecuente en la mayoría de las células de tipo fusiforme B.⁴

Las células epitelioides son más grandes y pleomorfas que las de tipo fusiforme. Generalmente, tienen abundante citoplasma eosinófilo, vidrioso, dando a la célula su forma redonda o poliédrica; tiene un borde celular distinguible, con una membrana celular más claramente delimitada, a menudo con espacio extracelular entre células adyacentes. La cohesividad entre las células es mucho menor que en las de tipo fusiforme; esta pérdida de la cohesión es característica de las células de tipo epitelioides y es uno de los principales criterios que las distingue del tipo fusiforme. Otras características distintivas son los núcleos más redondos y más grandes, con bordes angulares, indentaciones irregulares y excrecencias. La cromatina es más grosera y periférica; el nucléolo es prominente y eosinófilo; a veces pueden verse células epitelioides multinucleadas y bizarras.⁶⁶ La actividad mitótica es generalmente mayor en las células epitelioides que en las fusiformes (*Tabla 1*).⁴

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS TIPOS CELULARES					
TIPO CÉLULA	FORMA Y TAMAÑO	CITOPLASMA	NÚCLEO	NUCLÉOLO	OTROS
FUSIFORME A	Elongadas o pequeñas y redondas dependiendo del plano de corte Membrana celular no visible	Generalmente escaso Puede ser relativamente abundante	Elongado Cromatina fina A menudo hendidura longitudinal	No visible	Patrón cohesivo Mitosis extremadamente raras
FUSIFORME B	Elongadas o redondas dependiendo del plano de corte Membrana celular no visible (sincitial)	Relativamente escaso	Más grande que fusiforme A Cromatina grosera	Bien definido Pequeño y redondo A menudo excéntrico	Patrón menos cohesivo que fusiforme A Mitosis ocasionales
EPITELIOIDE	Más grandes y pleomorfas que las fusiformes, a menudo poligonales Membrana celular patente	Abundante Eosinófilo	Más grande Redondo Pleomorfo Cromatina marginal Puede ser múltiple	Más grande Eosinófilo Generalmente central Puede ser múltiple	Pérdida de cohesividad Más mitosis

Tabla 1. Características morfológicas de los tipos celulares.

Callender et al.⁶⁶ clasificaron los melanomas uveales en seis grupos: cuatro de ellos atendiendo al aspecto citológico del tumor y dos grupos adicionales según las características histológicas. Los cuatro grupos basados en la citología fueron:

- ❖ Tumores constituidos por células fusiformes tipo A (*Fig. 15*)
- ❖ Tumores formados por células fusiformes tipo B (*Fig.16*)
- ❖ Tumores compuestos por células epitelioides (*Fig.17*)
- ❖ Tumores mixtos con una mezcla variable de células fusiformes y epitelioides (*Fig.18*).

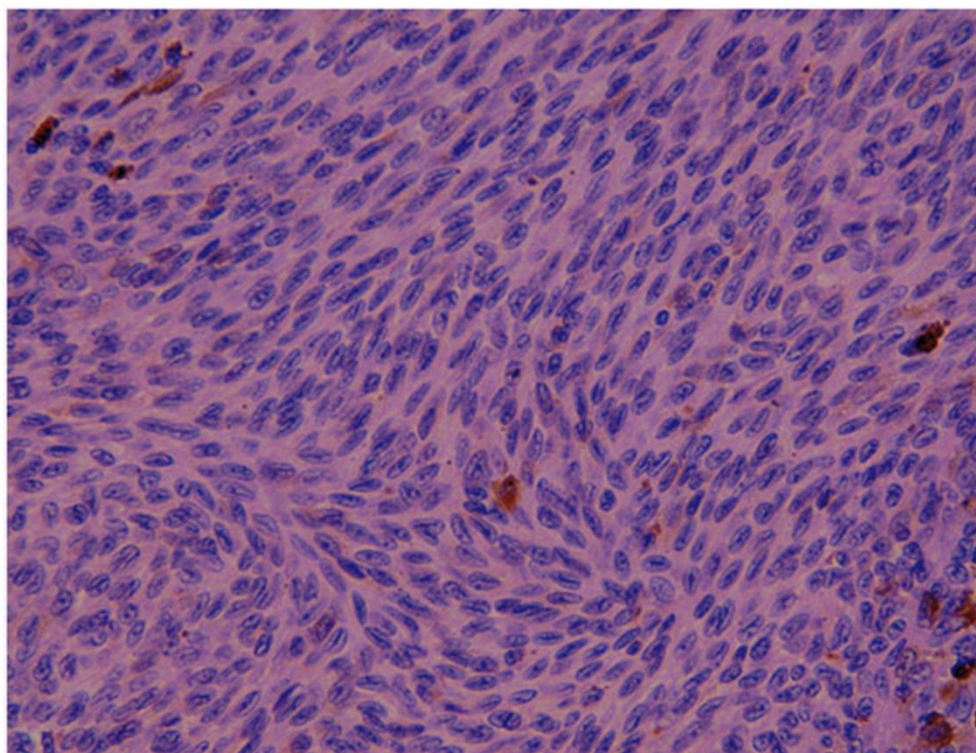


Figura 15. Melanoma de células fusiformes tipo A (HE, 40x).

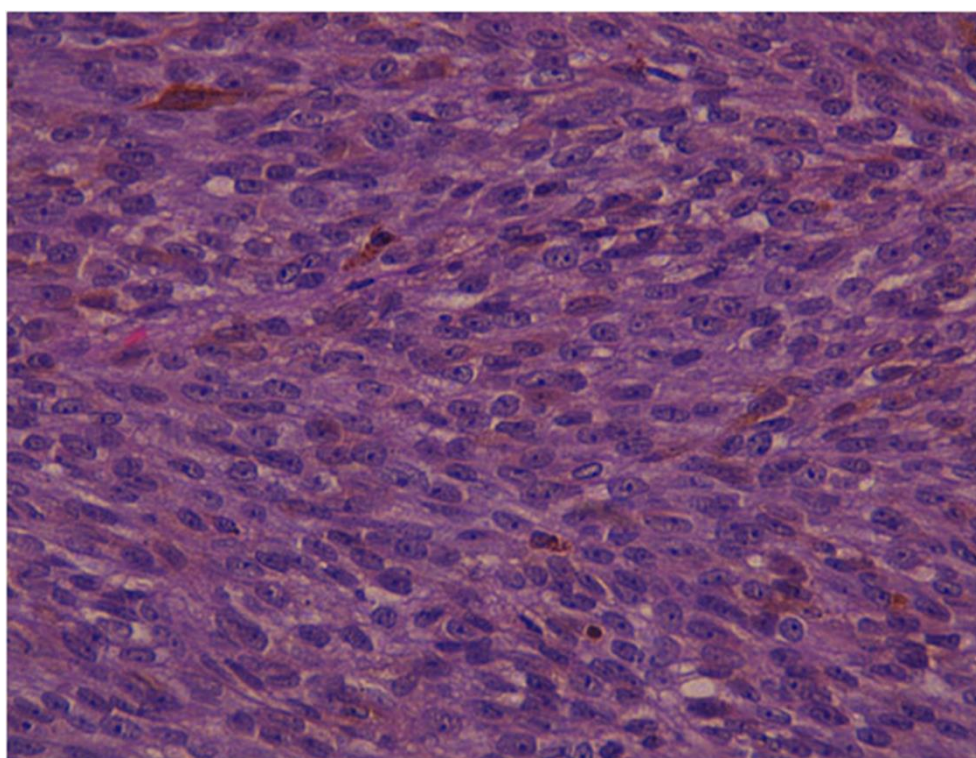


Figura 16. Melanoma de células fusiformes tipo B (HE, 40x).

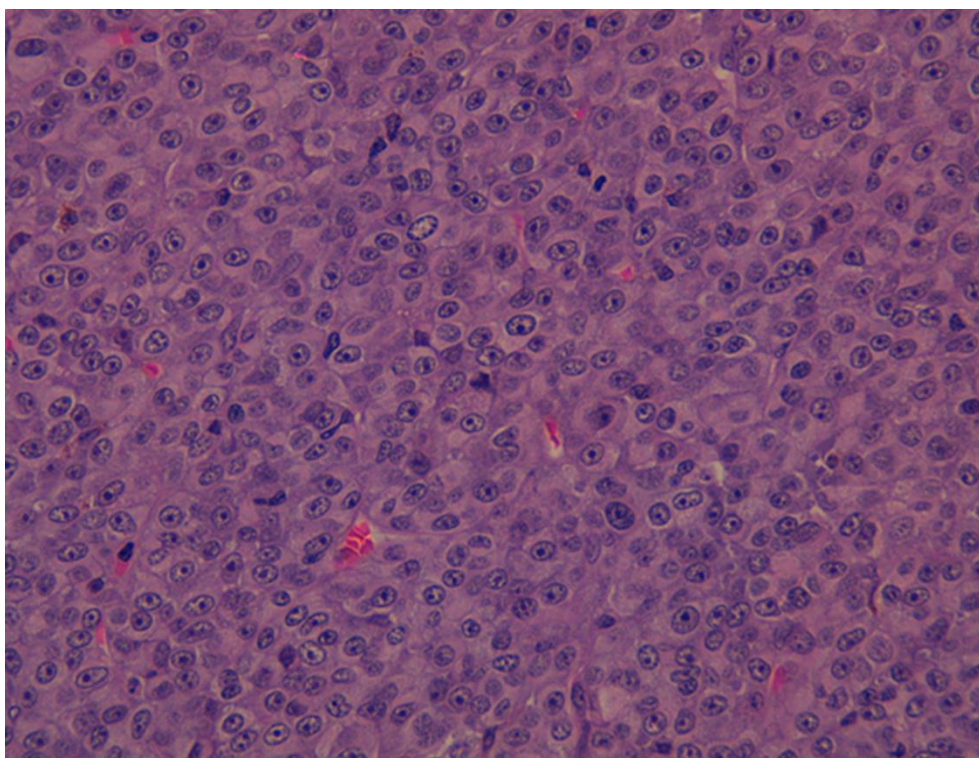


Figura 17. Melanoma de células epitelioides (HE, 40x).

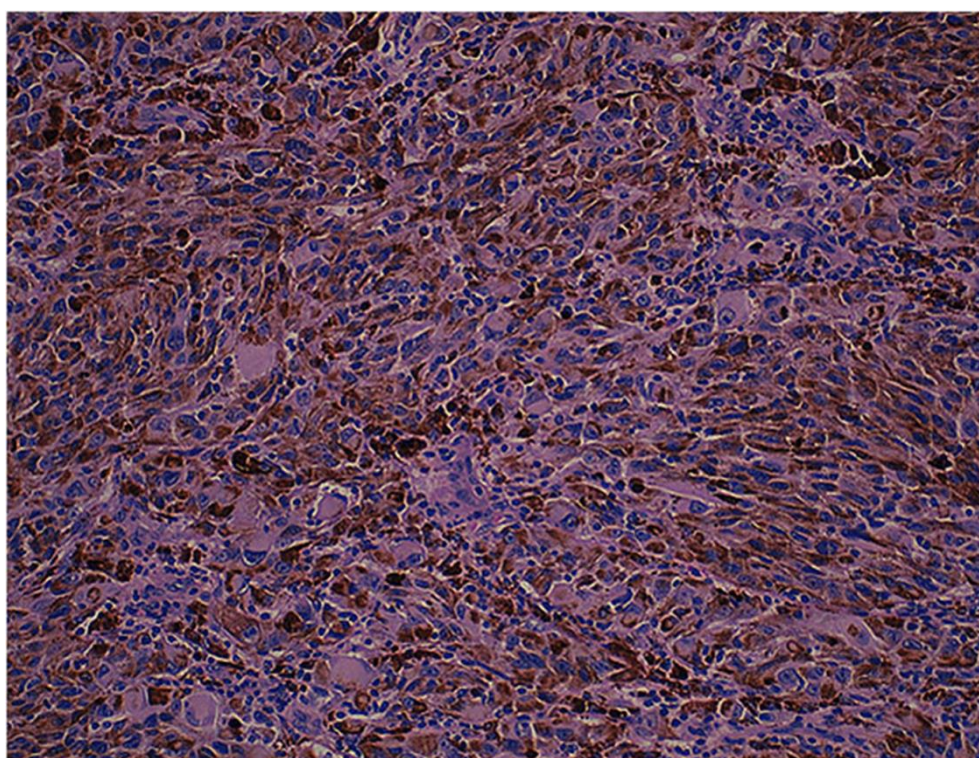


Figura 18. Melanoma mixto (HE, 20x).

El quinto grupo consistía en tumores con un patrón fasciculado donde las células estaban dispuestas formando haces o fascículos, un patrón más fácilmente apreciado en la microscopía óptica a bajo aumento; las células podían ser fusiformes A, fusiformes B, o una combinación de ambas. Existían dos tipos de patrón fasciculado en el melanoma uveal, vasocéntrico y tipo Verocay. En el primero, las células eran predominantemente de tipo fusiforme B, con los núcleos dispuestos en columnas perpendiculares a un vaso sanguíneo central (*Fig.19*). En los tumores con patrón tipo Verocay, las células, generalmente de tipo fusiforme A, se disponían en haces con los núcleos en empalizada formando bandas a través del haz (*Fig.20*).

El sexto grupo estaba compuesto por tumores necróticos; un tumor era clasificado como necrótico cuando presentaba un componente necrótico tan extenso que impedía determinar adecuadamente el tipo celular y no permitía ser clasificado en alguno de los grupos anteriores (*Fig.21*). La necrosis puede llevar a la formación de áreas quísticas dentro del tumor o a la acumulación extensa de detritus eosinófilos que contienen a veces cristales de colesterol.⁶⁷

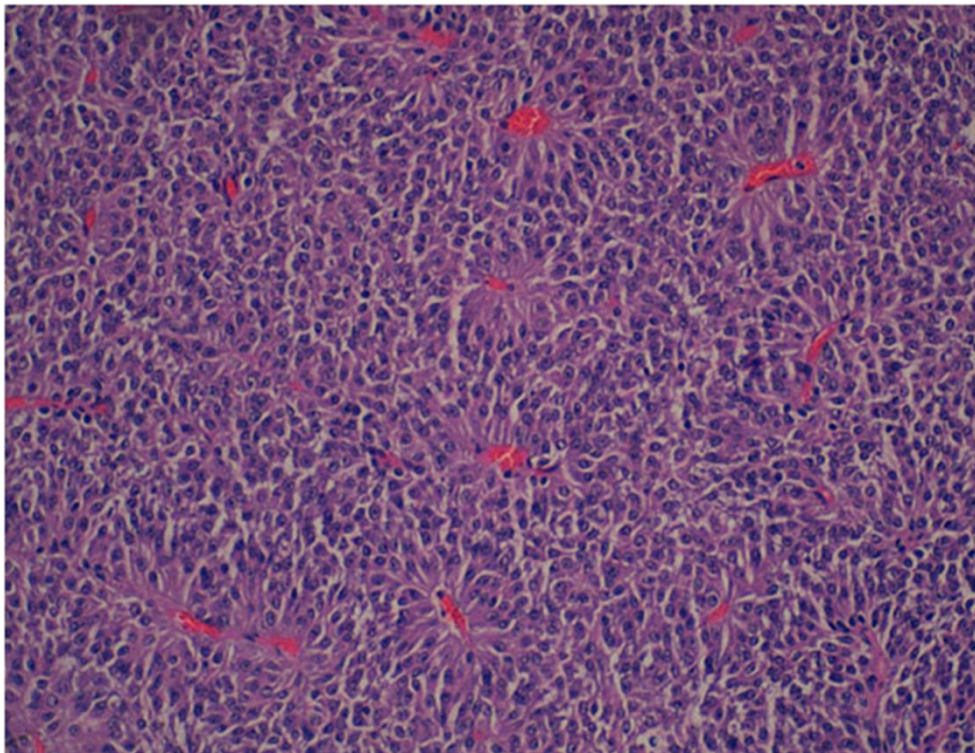


Figura 19. Melanoma con patrón vasocéntrico (HE, 20x).

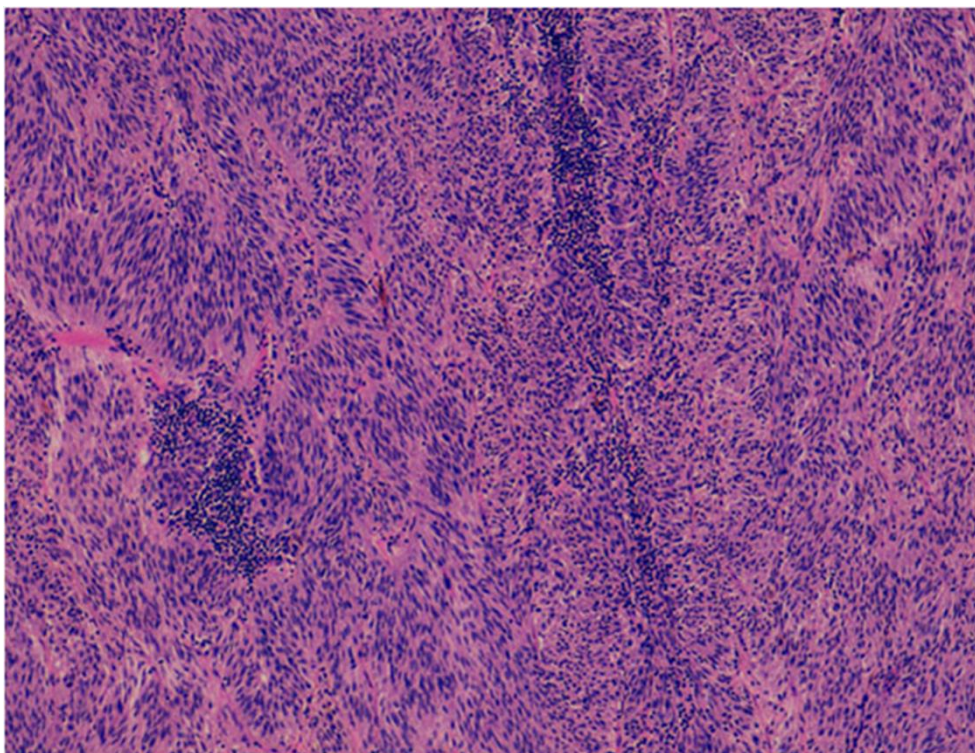


Figura 20. Melanoma con patrón fasciculado de tipo Verocay (HE, 10x).

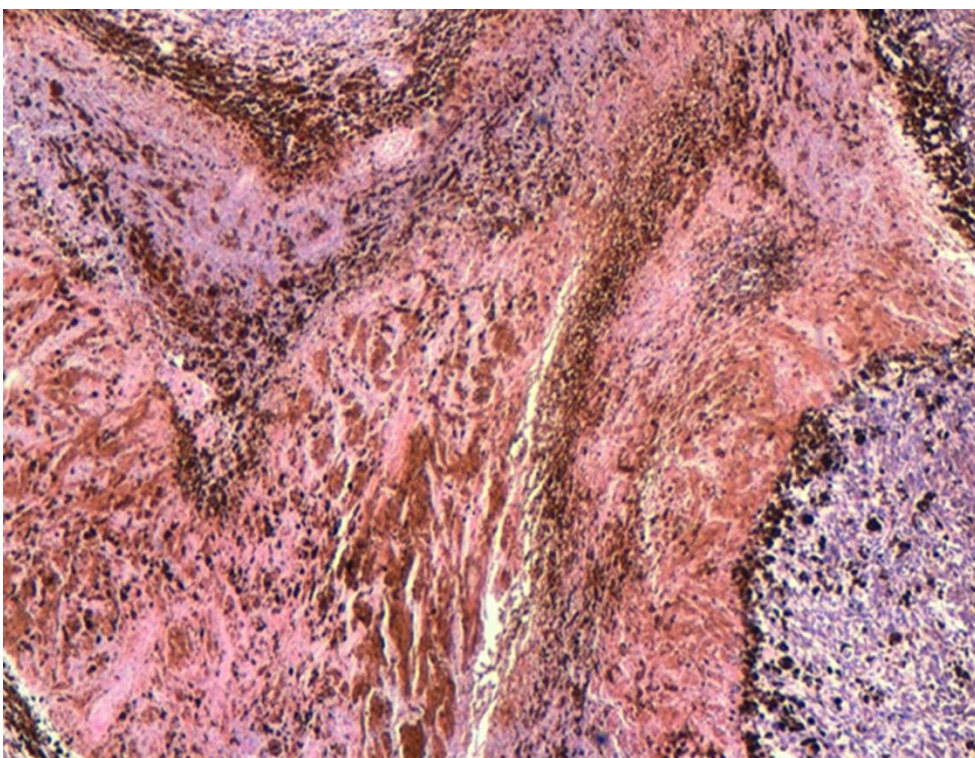


Figura 21. Melanoma necrótico (HE, 4x).

Varios autores han documentado la frecuencia y significado pronóstico de las seis clases de melanoma uveal. En 1951, Wilder y Paul⁶⁸ estudiaron 1.064 casos de melanoma uveal con al menos cinco años de seguimiento en el Registro de Patología Oftálmica (ROP) de los Estados Unidos de Norteamérica. Los tumores de tipo celular mixto fueron los más comunes, representando aproximadamente la mitad (48%) de los melanomas uveales. Los siguientes más prevalentes, suponiendo un tercio (32%), fueron los tumores de células fusiformes tipo B. Los porcentajes de tumores de tipo necrótico, fusiforme A, fasciculado y epitelioides representaron el 8%, 6%, 5%, y 2%, respectivamente. El grupo con un mejor pronóstico estaba formado por tumores de células fusiformes tipo A, fusiformes tipo B, y de tipo fasciculado; los pacientes con estos tipos de tumores tenían una tasa de mortalidad debida a metástasis del 22%. En cambio, el grupo con un peor pronóstico constaba de tumores de tipo necrótico, de tipo mixto, o epitelioides; los pacientes con estos tipos de tumores presentaban una tasa de mortalidad del 62%.

Aunque la clasificación de Callender ha sido utilizada en la mayoría de los laboratorios de Patología Oftálmica durante años, se ha criticado tanto por ser demasiado complicada como por ser muy simple.⁴ Investigadores posteriores en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFID) simplificaron la clasificación de Callender excluyendo el tipo fasciculado y uniendo los dos tipos de tumores fusiformes A y B. Así, esta clasificación de Callender modificada propone tres tipos de tumores principales: tumores de células fusiformes, de células epitelioides y de tipo mixto.⁶⁹

El diagnóstico del tipo fasciculado planteó dificultades, ya que su valoración no estaba fundamentada en criterios citológicos sino en un patrón histológico. En 1962, Paul et al.⁷⁰ argumentaron que el pronóstico de los pacientes con tumores de tipo fasciculado y fusiforme B era similar. Desde 1962, los tumores fasciculados han sido clasificados por el AFIP según su composición citológica. Aunque la mayoría de los tumores fasciculados están compuestos por una mezcla de células fusiformes del tipo A y del tipo B, algunos contienen sólo células fusiformes de tipo A, mientras que otros son de tipo B.⁴

En 1978, McLean et al.⁷¹ reexaminaron 105 tumores originalmente clasificados como fusiforme tipo A por sus predecesores en el AFIP. Estos autores encontraron que 15 de estos 105 tumores fueron citológicamente benignos. Dado que ninguno de los pacientes con estos tumores murió, los autores los reclasificaron como nevus de células fusiformes. Además, documentaron varios ejemplos de tumores compuestos de células fusiformes de tipo A citológicamente malignas, sin células fusiformes de tipo B o epitelioides, que murieron por metástasis. La conclusión más importante de esta revisión fue que los melanomas fusiformes de tipo A de Callender representaban un espectro en los que se habían incluido tanto neoplasias benignas como malignas. Puesto que el pronóstico de los tumores fusiformes de tipo A citológicamente malignos era similar al del tipo B, McLean et al. recomendaron que los tipos de células fusiformes A y B se unieran y se denominaran melanomas de células fusiformes.

En 1977, Gass⁷² consideraba que la forma de realizar el diagnóstico era muy poco objetiva, ya que Callender no estableció claramente los criterios para diferenciar los tumores fusiformes y epitelioides puros de aquellos que consideró mixtos.

El mayor problema con la clasificación de Callender es el que representa su simplificación, por lo que el esquema es difícil de reproducir, incluso entre experimentados patólogos oculares.⁴ La dificultad se debe a que las características citológicas de las células reflejan un espectro continuo que se resiste a la categorización artificial.^{9,73} Se han descrito células con características citológicas diferentes en el melanoma uveal tales como, las células balonizantes, las células en anillo de sello y las células claras.^{74,75} Las células balonizantes contienen un núcleo central o excéntrico, pequeño e hipercromático con un citoplasma abundante que contiene múltiples vacuolas. Estas células se consideran actualmente que son melanocitos alterados y se desarrollan como resultado del acúmulo intracitoplásmico de lípidos.⁷⁶ Las células en anillo de sello presentan un citoplasma claro con un núcleo hipercromático excéntrico, rechazado a la periferia. Estas células presentan acúmulos de filamentos de vimentina intracitoplásmico. Tanto las células en anillo de sello como las balonizantes se han observado en melanomas uveales radiados.⁷⁴ Por último, las células claras se caracterizan por presentar gránulos de glucógeno en su citoplasma.^{74,75} Aunque es posible encontrar de manera ocasional células con citoplasma claro en el melanoma

uveal (*Fig.22*), es raro encontrar melanomas uveales compuestos casi exclusivamente por estas células.⁷⁴

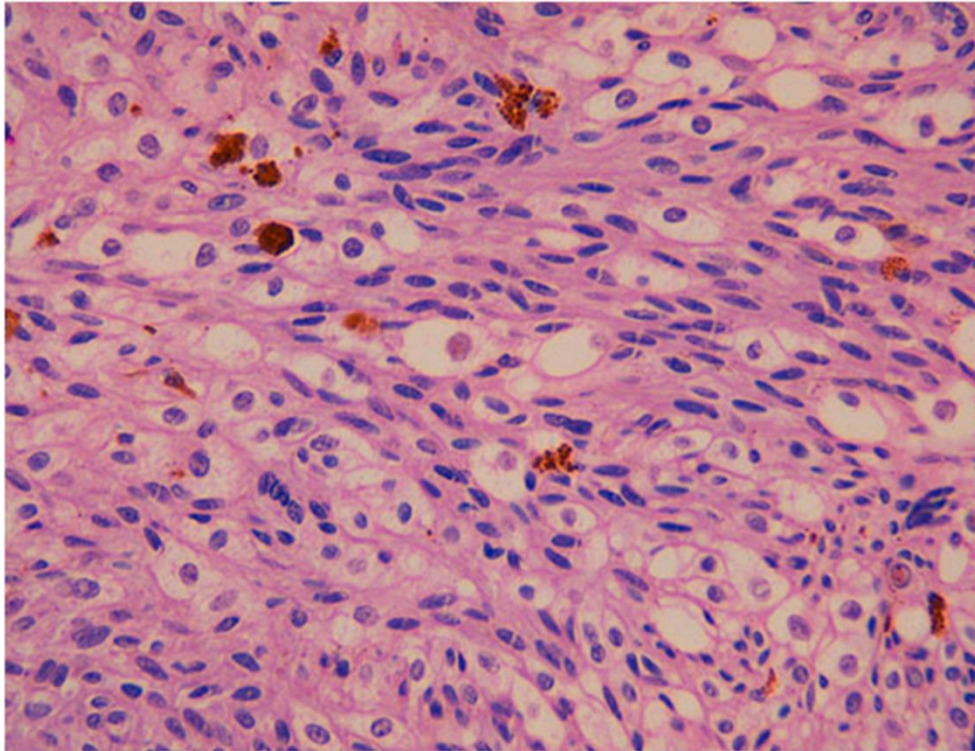


Figura 22. Melanoma con células claras (HE, 40x).

El melanoma de tipo mixto de Callender causa problemas adicionales. No hay acuerdo en cuanto a qué porcentaje de las células tienen que ser fusiformes y epitelioides para clasificar un tumor como del tipo mixto.⁴

Según el Collage of American Pathologist (CAP)⁷⁷ los melanomas uveales se dividen en tres tipos:

- ❖ Melanoma de célula fusiforme (más del 90% de células fusiformes).
- ❖ Melanoma de célula epiteliode (más del 90% de células epitelioides).
- ❖ Melanoma de tipo mixto (más del 10% de células epitelioides y menos del 90% de células fusiformes).

2.4.- FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA UVEAL

La identificación y el estudio de los factores pronósticos tumorales es importante para comprender la biología de los procesos neoplásicos. Además, ayudan a predecir la evolución de los pacientes, permiten la estratificación de los mismos en grupos pronósticos, sugieren sensibilidad de los tumores a nuevos tratamientos oncológicos e identifican a aquellos pacientes con riesgo de recidiva de la enfermedad.⁹

En el melanoma uveal se han propuesto muy diversos factores pronósticos clínicos, histopatológicos, citológicos y genéticos que pueden influir en la supervivencia de los pacientes afectados por este tumor y que tratamos a continuación.

2.4.1.- FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS

Entre los factores clínicos que se relacionan con el pronóstico se incluyen la localización en la úvea, el tamaño tumoral, la configuración o patrón de crecimiento, la afectación del cuerpo ciliar, el estadio según el sistema TNM, el método de tratamiento, la edad y el sexo.

a) Localización

El melanoma uveal se puede originar en el iris, el cuerpo ciliar o la coroides (*Fig. 23-25*). Cuando un melanoma de iris o de coroides invade el cuerpo ciliar, puede ser difícil de determinar la localización uveal inicial donde el tumor se originó.^{1,4,9-12,35}

Según el American Joint Committee on Cancer (AJCC) los melanomas del iris se originan en esta región de la úvea y se localizan predominantemente en ella. Si menos de la mitad del volumen tumoral se localiza dentro del iris, el tumor se pudo originar en el cuerpo ciliar y se debe considerar clasificarlo de modo adecuado.⁷⁷ Pe´er et al.⁷⁸ consideran un melanoma del cuerpo ciliar cuando 2/3 partes de la masa tumoral se localiza en dicho componente del tracto uveal. Otros autores, en cambio, definen al melanoma del cuerpo ciliar si más del 50% del tumor afecta a esta estructura.⁷⁹

El melanoma de iris (melanoma uveal anterior) se asocia con una mortalidad mucho más baja que el melanoma de cuerpo ciliar y coroides (melanoma uveal posterior),^{39,80} quizá debido al hecho de que estos tumores son visibles y por ello relativamente pequeños en el momento del diagnóstico^{40,73,81} y a que son de células fusiformes en lugar del tipo celular epiteliode más agresivo.⁸² Su perfil citogenético tiende a ser diferente al de los melanomas del cuerpo ciliar y coroides, lo que sugiere diferencias biológicas.⁸³ Davirdorf,⁸⁴ enfatizó que el melanoma de iris se descubría cuando el volumen tumoral medio era de 55 mm³, mientras que el melanoma de coroides generalmente se diagnosticaba cuando presentaba un volumen medio de 300 mm³. Esta diferencia en la carga tumoral en el momento del diagnóstico podía explicar la diferencia en el pronóstico de sólo el 3% de metástasis en el melanoma de iris y aproximadamente el 15% de metástasis en el melanoma de coroides.

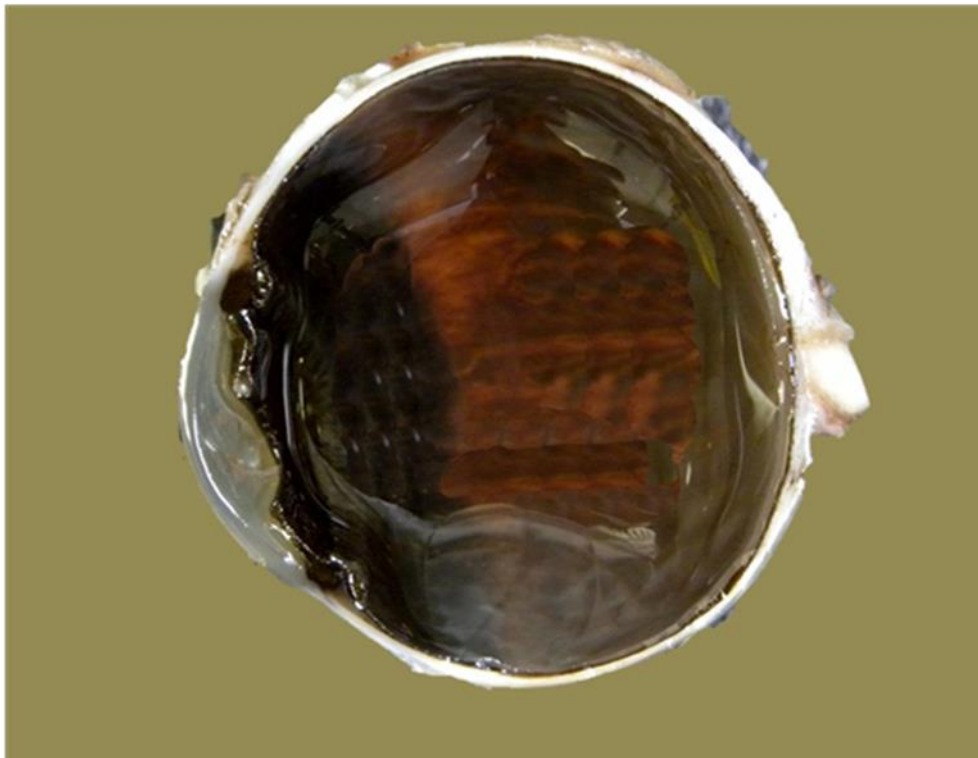


Figura 23. *Melanoma de iris.*

En 1958, Rones y Zimmerman⁸⁰ publicaron una mortalidad del 6% a los 10 años en los melanomas del iris. Los 72 casos de esta serie fueron tratados mediante iridectomía. Sunba et al.⁸⁵ encontraron que el 3,5% de los pacientes con melanomas de iris documentados en el Departamento de Patología del Instituto de Oftalmología de

Londres desarrollaron focos metastásicos a los cinco años. Posteriormente, en una gran serie (3432 casos) de melanoma uveal del Registro de Patología Oftálmica del AFIP, McLean et al.⁷³ advirtieron una mortalidad 10 veces más baja en el melanoma del iris que en el melanoma del cuerpo ciliar y de coroides. Más tarde, Geisse y Robertson⁸⁶ realizaron una revisión de la literatura sobre el melanoma del iris confirmando la baja incidencia de metástasis en un 3%. Shields et al.³⁹ identificaron los factores de riesgo de metástasis en un estudio retrospectivo de 169 casos de melanoma de iris. Utilizando el método analítico de Kaplan-Meier, las metástasis se apreciaron en el 3% de los casos a los 5 años, 5% a los 10 años y 10% de los casos a los 20 años. En 2009, el mismo autor determinó la tasa de metástasis del melanoma uveal de un total de 8033 casos. De los 285 casos con melanoma de iris, la tasa de metástasis a los 10 años (6,9%) fue aproximadamente cinco veces menor que la de los 492 casos con melanoma del cuerpo ciliar (33,4%) y cuatro veces menor que la de los 7256 casos con melanoma de coroides (25%).¹⁷

El melanoma del cuerpo ciliar tiene peor pronóstico que el melanoma de coroides.^{81,87,88} En una serie de 267 pacientes con melanoma uveal tratados mediante enucleación, la mortalidad a los cinco años por melanoma del cuerpo ciliar fue del 53% y del 14% en el melanoma coroideo.⁸⁷ De los 136 pacientes con melanoma del cuerpo ciliar tratados con placas radioactivas, el análisis Kaplan-Meier mostró una mortalidad del 28% a los cinco años. El tiempo medio para desarrollar metástasis fue de 68 meses (con una variación de 25 a 178 meses). El único predictor de metástasis era el grosor tumoral superior a 7 mm, los cuales eran 2,5 veces más propensos a desarrollar metástasis que los pacientes con melanoma de cuerpo ciliar más fino.⁷⁹ Aunque los melanomas del cuerpo ciliar suelen ser de mayor tamaño que los melanomas coroides en el momento del diagnóstico, se ha observado estadísticamente que el pronóstico es peor para los melanomas de cuerpo ciliar independientemente del tamaño y tipo celular de la neoplasia.⁸⁷ Otros autores consideran que el retraso en el diagnóstico, el mayor tamaño tumoral, o quizás, factores biológicos intrínsecos tales como tipo celular más agresivo, la alta incidencia de alteraciones microvasculares o cromosómicas podrían ser responsables del peor pronóstico de este melanoma. El diagnóstico del melanoma del cuerpo ciliar puede retrasarse ya que el tumor se oculta detrás del iris y con frecuencia

no produce desprendimiento de retina, que típicamente es responsable de la pérdida de visión, síntoma de presentación más frecuente del melanoma uveal.⁸⁹ Sisley et al.⁹⁰ consideran que el comportamiento bastante más agresivo del melanoma del cuerpo ciliar puede atribuirse, en parte, a diferencias citogenéticas, lo que sugiere un comportamiento biológico diferente.



Figura 24. *Melanoma de cuerpo ciliar.*

El melanoma de coroides tiene un pronóstico intermedio entre el melanoma de cuerpo ciliar y el melanoma de iris.⁹¹

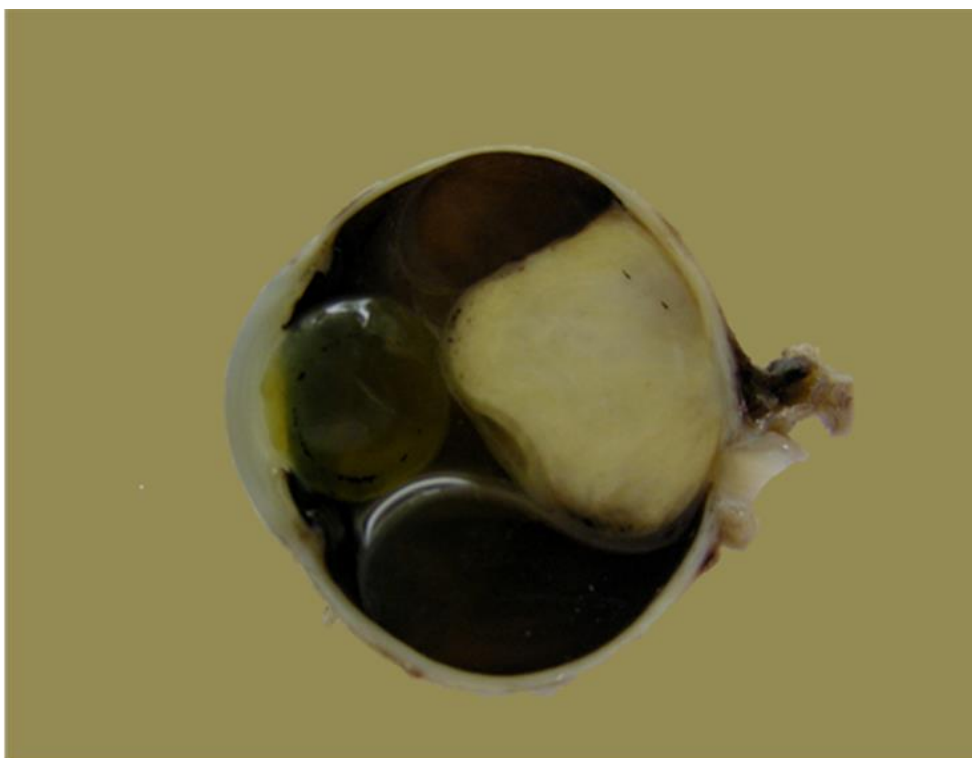


Figura 25. Melanoma de coroides.

b) Tamaño del tumor

Una de las características clínicas más importantes para la estimación del pronóstico del melanoma uveal es el tamaño tumoral.^{10,11,30,87,92-94} Se han utilizado varias medidas para establecer el tamaño del tumor tales como la altura apical, las dimensiones basales, la dimensión o diámetro basal mayor, la dimensión máxima tumoral,^{73,79,87} la longitud del arco del diámetro basal mayor,¹⁷ el volumen tumoral,⁹⁵ el espesor o grosor,⁹⁶ la longitud de la cuerda,⁹⁷ la dimensión tumoral máxima en contacto con la esclera⁹³ y el área de la base tumoral.⁴⁰ Entre todas ellas el diámetro tumoral basal mayor es el indicador más ampliamente utilizado, pero existe mucha variación en cuanto a la forma en que se puede medir.⁹⁸ El diámetro basal puede ser subestimado si el tumor tiene márgenes difusos o si presenta un crecimiento anular alrededor del cuerpo ciliar.⁹⁹ Algunos autores consideran el grosor o espesor tumoral como un buen predictor de supervivencia.¹⁷ Asimismo, el espesor tumoral es uno de los factores utilizados para estimar la supervivencia con el sistema de estadificación TNM del melanoma uveal.⁷⁷ En cambio, para otros autores, el espesor no parece ser un factor de

riesgo independiente significativo cuando el diámetro tumoral y otros predictores se tienen en cuenta.⁹⁸ Además, el grosor está influenciado no sólo por el crecimiento neoplásico sino también por la inflamación del tejido si existe prolapso tumoral a través de la membrana de Bruch, y por el edema intersticial.⁹⁹

Las dimensiones tumorales lineales se pueden estimar utilizando múltiples métodos de medición: oftalmoscopia, transiluminación, tomografía computarizada, ecografía, resonancia magnética y examen histopatológico.^{17,100,101} Sin embargo, las características tumorales pueden influir en la precisión de las medidas del tumor.¹⁰¹

Chard et al.¹⁰⁰ observaron una buena correlación entre las medidas clínicas, ecográficas y patológicas en 51 ojos enucleados pero encontraron que las medidas histopatológicas tendían a ser menores que las otras dos medidas. Esta apreciación también fue señalada por Nicholson et al.¹⁰² en un estudio comparativo de las medidas de la altura ecográfica e histopatológica en 53 pacientes sometidos a enucleación. Por término medio, la altura ecográfica era 2,2 mm mayor que la histopatológica, una diferencia que los autores atribuyeron a la reducción del tumor como consecuencia de la preparación y fijación del ojo en el laboratorio de Anatomía Patología. Se ha considerado, a veces, que la fijación, hidratación e inclusión en parafina puede reducir el tejido hasta un 33%.⁹⁴ Otros factores propuestos para justificar estas discrepancias incluyen la experiencia del clínico, la confusión entre la sangre y el tumor en el examen clínico, la sombra producida por tumores muy elevados durante el examen macroscópico, especialmente con la transiluminación,¹⁰³ y variaciones en el procesamiento histopatológico, diferencias en los métodos de sección, o cortes histopatológicos no representativos. Por el contrario, Augsburger et al.¹⁰¹ describieron que las medidas patológicas del tumor eran sistemáticamente mayor que la estimación clínica; los autores sugieren que la mala estimación clínica y la inadecuada orientación de los cortes macroscópicos podrían explicar la mayor parte de estas diferencias. También se han llevado a cabo correlaciones de las medidas del grosor tumoral mediante tomografía computarizada, ecografía y examen macroscópico. Según el COMS, las medidas ecográficas e histopatológicas de la altura apical coincidían ± 2 mm en el 90% de los casos, mientras que las medidas clínicas e histopatológicas del diámetro basal mayor lo hacían ± 2 mm en el 58% de los casos.¹⁰⁰

En 1955, Flocks et al.⁹⁴ sugirieron utilizar el volumen aproximado tumoral empleando las medidas de las tres dimensiones principales. Este volumen, obviamente, exageraba el volumen real del tumor pero se relacionaba estrechamente con la evolución del paciente.

McLean et al.⁹⁵ analizaron 217 casos de melanomas uveales pequeños (menores de 1400 mm³) y encontraron que existía una ligera asociación entre el volumen y la evolución, pero mucho más importante, que la dimensión máxima tumoral era un pronosticador mucho mejor que el volumen. Existían probablemente varias razones por las que la dimensión máxima tumoral tenía una mejor asociación con la evolución de los pacientes que el volumen. La más importante era que los melanomas difusos, que presentan un peor pronóstico, típicamente tenían un tamaño lineal muy grande pero un volumen pequeño. Otra razón es la dificultad para medir el volumen de los melanomas uveales. Todos los investigadores que han estudiado la dimensión máxima tumoral como una variable pronóstica la consideran altamente significativa.^{73,87,103}

Años más tarde, McLean et al.⁷³ dividieron un total de 3432 casos de melanomas uveales del cuerpo ciliar y coroides en tres grupos basándose en su diámetro máximo. Encontraron que los pacientes con tumores pequeños (< 11 mm de diámetro máximo) presentaban una mortalidad a los 10 años del 20%; entre los pacientes con tumores medianos (11-15 mm de diámetro máximo) la mortalidad fue el doble que la de los pacientes con tumores pequeños y finalmente en los pacientes con tumores grandes (>15 mm de diámetro máximo) fue tres veces mayor. Estos autores concluyeron que el tamaño tumoral medido por su diámetro máximo se correlaciona mejor con datos de supervivencia que el grosor de la lesión.

Diener-West et al.⁹⁴ (1992) llevaron a cabo un metaanálisis de ocho publicaciones sobre el pronóstico del melanoma uveal tras la enucleación en base a su tamaño tumoral graduado como pequeño, mediano y grande. Debido a que se trataba de un metaanálisis, existían numerosas definiciones individuales para cada categoría de tamaño. La definición del tamaño tumoral variaba por artículo y los tumores pequeños se definían con una de las siguientes: < de 3 mm de altura y < de 10 mm de diámetro, < de 10 mm de diámetro, ≤ de 10 mm de diámetro, < 11 mm de diámetro, < 11 mm de

diámetro o \leq de 2 mm de altura, o \leq de 300 mm³. Los tumores medianos presentaban 10-15 mm de diámetro, 11-15 mm de diámetro, 11-15 mm de diámetro ó 3-5 mm de altura, \leq 15 mm de diámetro. Los tumores grandes tenían $>$ 15 mm de diámetro, $>$ 15 mm de diámetro o $>$ de 5 mm de altura. Las estimaciones combinadas ponderadas de las tasas de mortalidad a los cinco años fueron del 16% para los tumores pequeños ($<$ 3 mm de altura y $<$ 10 mm de diámetro basal), 32% para los tumores medianos (3-8 mm de altura y $<$ 15 mm de diámetro basal) y 53% para los tumores grandes ($>$ 8 mm de altura o $>$ 15 mm de diámetro basal). Estos resultados apoyan la conclusión de otros investigadores de que el tamaño tumoral en el momento de la enucleación es un factor pronóstico importante para los pacientes con melanoma uveal. Estos autores reconocen las dificultades para realizar este metaanálisis, destacando la población heterogénea, el tratamiento, diferentes métodos para notificar la mortalidad y sobre todo las diferentes definiciones del tamaño tumoral.

En 2003, Kujala et al.³⁰ evaluaron el pronóstico a largo plazo de 289 pacientes con melanoma uveal. Mediante el análisis de Kaplan-Meier hallaron metástasis de melanoma en el 32% a los 5 años, 50% a los 15 años, 56% a los 25 años, y 62% a los 35 años. El tamaño tumoral se graduó por el diámetro (sin medir el espesor) y Kaplan-Meier estimaba una mortalidad asociada al melanoma del 8%, 12%, 18% y 42% a los 5, 15, 25 y 35 años, respectivamente, para los tumores pequeños ($<$ 10 mm de diámetro basal máximo), 32%, 48%, 60%, y 60%, respectivamente, para los tumores medianos (10-15 mm de diámetro basal máximo), y 50%, 63%, 66%, y 75%, respectivamente, para tumores grandes ($>$ 15 mm diámetro basal máximo). Cada incremento de milímetro en el diámetro tumoral mostraba una hazard ratio de 1,08.

Shields et al.¹⁷ determinaron mediante un estudio retrospectivo de 8033 melanomas uveales la tasa de metástasis en base al grosor tumoral. El análisis multivariante puso de manifiesto que el grosor tumoral era un importante factor predictivo de metástasis. Las metástasis en los melanomas pequeños (0-3,0 mm de espesor) fueron del 6%, 12%, y 20% a los 5, 10, y 20 años respectivamente; 14%, 26%, y 37% en los melanomas medianos (3,1-8 mm de espesor); y 35%, 49%, y 67% en los melanomas grandes. Más específicamente, las metástasis por incremento de un milímetro a los 10 años fueron: 6% (0-1,0 mm de espesor), 12% (1,1-2,0 mm de

espesor), 12% (2,1-3,0 mm de espesor), 16% (3,1-4,0 mm de espesor), 27% (4,1-5,0 mm de espesor), 28% (5,1-6,0 mm de espesor), 29% (6,1-7,0 mm de espesor), 41% (7,1-8,0 mm de espesor), 50% (8,1-9,0 mm de espesor), 44% (9,1-10,0 mm de espesor), y 51% (>10,0 mm).

El tamaño tumoral se puede definir siguiendo tanto la clasificación TNM como los criterios del Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS). Ambos diferencian entre melanomas pequeños, medianos y grandes en base a la dimensión basal mayor (mm) y a la altura máxima (mm). El COMS considera tumores pequeños los que tienen una altura máxima \leq a 2,5 mm y una base máxima \leq a 16 mm; medianos aquellos que tienen una altura máxima $>$ de 2,5 mm y \leq a 10 mm y una base máxima \leq a 16 mm, y grandes los que tienen una altura máxima $>$ de 10 mm o una base máxima $>$ de 16 mm.¹⁰⁰

En resumen, el tamaño tumoral es un importante factor pronóstico en los pacientes con melanoma uveal. La evaluación precisa del mismo es crucial tanto en la selección del tratamiento como en la planificación de tratamientos tales como la braquiterapia. El problema de utilizar el tamaño como característica pronóstica, sin embargo, se relaciona con la dificultad en la medición del tamaño de tumores con forma irregular.⁴

c) Configuración o patrón de crecimiento tumoral

La forma del melanoma uveal puede variar desde una lesión relativamente plana-difusa hasta un tumor redondeado. Algunos tumores penetran a través de la membrana de Bruch adquiriendo una forma “en champiñón”, pero la ruptura de dicha membrana no ensombrece el pronóstico.^{79,87} Los melanomas uveales difusos tienen mal pronóstico. En un estudio realizado por Shields et al.¹⁷ de 8033 ojos enucleados, el melanoma difuso representaba el 3% de todos los melanomas uveales. Los melanomas difusos tenían un riesgo relativo de metástasis de 3,84 en comparación con los melanomas no difusos. En otro estudio de 111 melanomas coroides difusos, la probabilidad de desarrollar metástasis a los 3, 5 y 10 años, en estimación de Kaplan-Meier, fue del 16%, 24% y 36%, respectivamente. Los factores clínicos predictivos de

metástasis mediante análisis univariante incluyeron: la dimensión basal tumoral de 18 mm o más, la invasión del nervio óptico, la extensión extraescleral y los márgenes tumorales mal definidos. El análisis multivariante mostró que dichos factores eran los mismos anteriormente descritos a excepción de la extensión extraescleral.⁴⁵ El mal pronóstico en el melanoma corioideo difuso puede ser atribuido al retraso en el diagnóstico correcto, a la mayor proporción de células epitelioides o a su tendencia a la extensión extraocular.^{45,46}

En una serie de 8800 pacientes con melanoma uveal, sólo 23 pacientes presentaron melanoma del cuerpo ciliar en anillo. En estos pacientes se observó una tasa de metástasis del 52% a los cinco años. La alta tasa de metástasis en estos pacientes se debe probablemente a las grandes dimensiones tumorales, al tipo celular mixto y a la extensión extraescleral.⁶³

El pronóstico del melanoma de iris difuso parece ser relativamente ominoso comparado con los tumores circunscritos. Globalmente, el melanoma de iris presenta una baja tasa de metástasis de aproximadamente el 2-3% a los cinco años, 4-5 % a los diez años, y 10% a los veinte años.^{39,80} Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Demerci et al.⁶³ de 25 pacientes con melanoma de iris difuso, la tasa de metástasis fue del 13% a los seis años. En cuanto al melanoma de iris en anillo, generalmente mal diagnosticado, presenta una mayor mortalidad relacionada con el tumor que los melanomas de iris focales.¹⁰⁴

El pronóstico de los pacientes con melanoma en anillo del ángulo de la cámara anterior es difícil de evaluar debido al escaso número de casos descritos en la literatura. Demerci et al.⁵⁹ observaron que el 25% de los pacientes desarrollaron metástasis tras un seguimiento medio de seis años, que es mucho más alto que la tasa de metástasis del melanoma de iris en general. El peor pronóstico del melanoma en anillo de la cámara anterior puede ser debido a la presión intraocular aumentada junto con la afectación del ángulo/raíz del iris que facilitan el acceso del tumor al canal de Schlemm como posible vía de extensión hematógica.

d) Afectación del cuerpo ciliar

Varios estudios han demostrado que la afectación del cuerpo ciliar (determinada por la localización del margen anterior del tumor) se asocia con un peor pronóstico de supervivencia.^{87,88} La explicación de esta correlación no está clara. Se ha sugerido para tratar de explicar esta asociación que si el melanoma uveal se origina cerca del cuerpo ciliar es poco probable que cause síntomas visuales antes de que el tumor alcance un tamaño considerable, y si es de coroides generalmente tiene que alcanzar un gran tamaño para llegar a afectar al cuerpo ciliar. En ambos casos, los tumores que afectan al cuerpo ciliar tienden a ser de mayor tamaño cuando son diagnosticados, y este factor afecta significativamente las tasas de mortalidad.¹⁰⁵

Rummelt et al.¹⁰⁶ publicaron que el peor pronóstico de los tumores con afectación del cuerpo ciliar podría explicarse en parte por la tendencia de estos tumores a presentar redes y asas microvasculares, que parecen estar asociados con la muerte relacionada con el melanoma. La presencia de una mayor vascularización también podría explicar el mayor tamaño de los melanomas del cuerpo ciliar. Para otros, el contacto con el músculo ciliar y su contracción facilitaría la extensión de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo.⁸⁷

McLean et al.⁸⁸ realizaron un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y de Cox univariante y encontraron que había asociación significativa entre la afectación del cuerpo ciliar y la mortalidad relacionada con el tumor. Sin embargo, al utilizar un modelo multivariante de Cox demostraron que la afectación del cuerpo ciliar ya no era estadísticamente significativa. Los melanomas uveales con afectación del cuerpo ciliar eran de mayor tamaño y tenían un nucléolo más grande y estaban compuestos por células epitelioides o de tipo mixto, factores todos ellos que se asocian con una mayor mortalidad.

e) Estadío según el TNM

Shields et al.¹⁰⁷ evaluaron las características clínicas y pronósticas de 7731 pacientes con melanoma uveal posterior (coroides y cuerpo ciliar) en base a la

clasificación del AJCC (American Joint Committee on Cancer) del tumor primario (T). Con respecto a los melanomas uveales clasificados como T1, el riesgo de metástasis y muerte fueron dos veces mayor para la categoría T2, cuatro veces para los T3, y ocho veces para la categoría T4. Es decir, el riesgo de metástasis y muerte se incrementaba dos veces con cada aumento de la categoría T.

El AJCC⁷⁷ ha revisado recientemente el sistema de estadificación TNM para el melanoma uveal con datos de 7369 pacientes de Berlín, Liverpool, Lyon, París y Helsinki. En este sistema TMN, la extensión del tumor primario (T), la presencia o ausencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M) proporciona información sobre la extensión de la enfermedad. El melanoma uveal metastatiza hematógicamente a menos que invada la conjuntiva, en cuyo caso puede extenderse a los ganglios linfáticos regionales, aunque ello es extremadamente raro. La clasificación se basa, por lo tanto, en la extensión del tumor primario y en la existencia de cualquier metástasis sistémica.

Este sistema categoriza a los melanomas de coroides y cuerpo ciliar según su tamaño, clasificados por el diámetro basal tumoral y la altura, teniendo en cuenta además la afectación del cuerpo ciliar y la extensión extraocular. La categoría T, basada en el tamaño tumoral (T1, T2, T3 y T4), se determina a partir de una tabla atendiendo al diámetro basal mayor y espesor tumoral. Las casillas que componen esta tabla han sido agrupadas en función de la probabilidad de supervivencia. Las estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier a los diez años para las categorías T1, T2, T3 y T4 fueron del 89%, 77%, 58%, y 39%, respectivamente.¹⁰⁸ Secundariamente, se determina una de las cinco subcategorías (a-e) de acuerdo a la existencia o no de afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular. La extensión extraescleral también se categoriza en base a su tamaño. La afectación del cuerpo ciliar y la extensión extraocular son los principales parámetros clínicos junto con el tamaño tumoral, que se asocian independientemente con el riesgo de metástasis.⁷⁷⁻¹⁰⁹

En base a la categoría TNM anatómica se reorganizan en los diferentes estadios (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV). Cada estadio incluye categorías anatómicas con similar pronóstico.¹¹⁰ Los diferentes estadios (I, IIA-B, IIIA-C, y IV) presentaron unas

tasas de supervivencia a los diez años del 88%, 80%, 68%, 45%, 26%, 21%, y 0% respectivamente, entre 5470 pacientes con melanoma uveal.⁷⁷

El melanoma de iris se estadifica mediante una clasificación del AJCC distinta de la del melanoma uveal posterior.^{77,107}

f) Método de tratamiento

Los objetivos del tratamiento del melanoma uveal son prevenir la extensión metastásica y conservar el ojo con una visión aceptable, si es posible.¹¹¹ La influencia del tratamiento ocular en la supervivencia aún se desconoce debido a que los mismos datos de supervivencia de las series de casos pueden ser interpretados de diferentes formas y además el tratamiento ocular varía ampliamente entre los diferentes centros.¹¹²

Zimmerman et al.¹¹³ publicaron sus observaciones sobre el aumento de la tasa de mortalidad unos años después de la enucleación. Estudiando 2300 casos, la tasa de mortalidad postoperatoria aumentó respecto a la tasa estimada antes de la enucleación desde un 1% al año hasta un pico del 8% durante el segundo año después de la enucleación, descendiendo a partir de entonces. Estos autores postularon que la enucleación tenía un efecto perjudicial respecto a las expectativas del curso natural de la enfermedad. Posteriormente, otros autores demostraron que la excesiva mortalidad después de la enucleación por melanoma uveal no se relacionaba con la enucleación sino con la fase activa de la progresión tumoral que llevó al diagnóstico.¹¹⁴

En estudios retrospectivos, las tasas de mortalidad en el melanoma uveal de un determinado tamaño fueron similares comparando los tratados mediante enucleación, radioterapia con placa,¹¹⁵ radioterapia con haces de protones¹¹⁶ y terapia con ión helio.¹¹⁷

El Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS)¹¹⁸ es un estudio internacional, multicéntrico y controlado que compara tasas de supervivencia y complicaciones de tratamiento basadas en diferentes alternativas terapéuticas en pacientes con melanoma coroideo, dependiendo además de los diferentes tamaños de los tumores. El COMS consta de: 1) Ensayo randomizado de pacientes con melanomas coroides medianos

tratados con enucleación versus braquiterapia con placa de I₁₂₅; 2) estudio randomizado de pacientes con melanomas coroides grandes tratados con enucleación solamente versus enucleación precedida de radiación externa; 3) estudio observacional prospectivo de pacientes con melanomas coroides pequeños para determinar si un ensayo randomizado de tratamiento es apropiado.

El COMS mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre los pacientes tratados con enucleación y braquiterapia con placa de I₁₂₅. Las tasas de supervivencia a los cinco años fueron del 81% y 82%, respectivamente.¹¹⁹

Los resultados del tratamiento de los melanomas coroides grandes con enucleación o radioterapia preoperatoria asociada no mostraron diferencias clínicas ni estadísticas significativas. A los cinco años la mortalidad fue de un 38% en los pacientes tratados con enucleación y de un 43% en los pacientes a los que se les asoció radioterapia preoperatoria. A los 10 años la tasa de mortalidad fue de un 40% y un 45%, respectivamente.¹²⁰

El estudio COMS ha conseguido resolver muchas dudas sobre el manejo del melanoma corioideo, a ello se le unen nuevos tratamientos que procuran evitar la enucleación y conservar la visión, intentando reducir las muertes por enfermedad metastásica. Pero dada la rareza del tumor es difícil evaluar estos nuevos tratamientos en grandes estudios clínicos.

g) Edad y sexo

Otros factores clínicos tales como la edad en el momento del diagnóstico y el sexo han sido objeto de estudio para determinar su papel como factores pronósticos. Se ha sugerido que la edad avanzada y el sexo masculino se correlacionan con una supervivencia reducida.^{87,121} Sin embargo, no está claro en qué medida estas correlaciones son el resultado de un sesgo derivado de otros riesgos (es decir, muerte por otras causas).³⁰

Unos pocos estudios han llegado a la conclusión de que el melanoma uveal en niños y adolescentes, en cuanto a su aspecto clínico o pronóstico, no difieren significativamente con respecto a su equivalente en adultos.^{22,70}

Por el contrario, otros estudios han demostrado que las metástasis son raras en niños con melanoma uveal y el pronóstico de vida es más favorable en comparación con los adultos. Algunos investigadores han especulado que el aparente pronóstico favorable de los niños con melanoma uveal es atribuible a un mayor porcentaje de melanoma de iris en esta edad, al menor tamaño tumoral en el momento de diagnóstico y a la baja incidencia de extensión extraocular.^{19,122}

Paul et al.⁷⁰ observaron una mortalidad por todas las causas a los 15 años del 65% en pacientes de 70 años o más en el momento del diagnóstico frente a un 35% en pacientes de 40 años o menos. Sin embargo, la edad en el momento del diagnóstico tenía un menor significado comparado con factores pronósticos histopatológicos.¹²³

Graell et al.¹⁸ realizaron un estudio retrospectivo de 303 pacientes diagnosticados de melanoma uveal y estudiaron su distribución por edades y relación con la supervivencia. La supervivencia en los pacientes < 50 años a los 2, 5 y 10 años de seguimiento fue del 91,41%, 81,83% y 61,45% respectivamente mientras que la supervivencia en los pacientes ≥ 50 años a los 2, 5 y 10 años fue del 90,86%, 73,18% y 58,28% respectivamente, diferencia no estadísticamente significativa entre los dos grupos de edad. Cuando consideraron el factor sexo en los pacientes ≥ 50 años encontraron una mayor supervivencia entre los hombres respecto a las mujeres. Este grupo de estudio concluyó que el melanoma de úvea en España seguía un patrón de distribución por edades muy similar al descrito en otras series de otros países, no siendo infrecuente el diagnóstico en pacientes jóvenes < 40 años. Las tasas de supervivencia también eran similares a otras series aunque no pudieron demostrar un pronóstico vital diferente según la edad de presentación de los pacientes.

En 2008, Virgili et al.¹²² estimaron la supervivencia en 5788 pacientes europeos con melanoma uveal. Mostraron que la supervivencia relativa a los cinco años en los pacientes con melanoma de úvea descendía con el incremento de la edad en el momento del diagnóstico, como la mayoría de los cánceres. Estos resultados eran comparables

con los de estudios poblacionales que investigaban la supervivencia relativa a los cinco años en pacientes con melanoma uveal en Estados Unidos, Suecia, Dinamarca y Reino Unido.

Un reciente gran análisis del pronóstico del melanoma uveal basado en la edad del paciente reveló un mejor pronóstico en los pacientes más jóvenes. Shields et al.¹²⁴ evaluaron 8033 casos de melanoma uveal y las estimaciones de Kaplan-Meier de las muertes relacionadas con el tumor a los diez años fueron del 5% en jóvenes, 11% en adultos de edad media y 16% en adultos mayores. Sin embargo, estos resultados incluían todas las localizaciones uveales y como es bien conocido los pacientes más jóvenes presentan sustancialmente mayor incidencia de melanoma de iris que los pacientes mayores lo que podría provocar el sesgo hacia un pronóstico más favorable.

Kaliki et al.²⁰ proporcionaron un análisis más apropiado de la influencia de la edad en el pronóstico mediante un estudio de cohorte retrospectivo pareado con 122 pacientes jóvenes (< 20 años) con melanoma uveal frente a controles de 122 adultos jóvenes (21-60 años) y 122 adultos mayores (> 60 años). Las estimaciones de Kaplan-Meier de las tasas de metástasis a los 3, 5 y 10 años fueron más bajas en los jóvenes (1%, 8% y 8% respectivamente) en comparación con los adultos jóvenes (5%, 11% y 26%) y adultos mayores (13%, 16% y 24%). Tras la exclusión de los melanomas de iris, las metástasis a los 3, 5 y 10 años fueron 2%, 11% y 18% en jóvenes; 9%, 14% y 21% en adultos jóvenes; y 9%, 34%, y 33% en adultos mayores. Así, los pacientes con melanomas de coroides o cuerpo ciliar presentaban menor tasa de metástasis que los otros dos grupos de pacientes. Los factores de riesgo de metástasis basados en análisis multivariante incluyeron el aumento de la edad en jóvenes, el sexo masculino en adultos de edad media y el diámetro tumoral basal mayor en los adultos de edad media y mayores. Por tanto, parece que los pacientes más jóvenes en el momento del diagnóstico se asocian con un mejor pronóstico en comparación con los adultos de edad media y mayores.

En cuanto al sexo, el estudio de Virgili et al.¹²¹ demostró diferencias entre sexos, con una mortalidad de un 10% mayor en hombres. En estudios previos realizados en Suecia, Dinamarca y Reino Unido se sugirió mejor supervivencia en mujeres; sin

embargo, estas diferencias en el sexo no fueron estadísticamente significativas en estos estudios. Las posibles causas de la diferencia entre sexo en la supervivencia no está clara. El COMS no encontró diferencias en el sexo en cuanto a la supervivencia.¹²⁰

Zloto et al.²⁷ llevaron a cabo un estudio retrospectivo de 732 pacientes con melanoma uveal, siendo uno de sus objetivos más importantes determinar si el sexo jugaba un papel en el pronóstico de dicho melanoma. Los resultados de este estudio sugirieron que el pronóstico del melanoma uveal en hombres era peor que en mujeres. Los hombres presentaban más metástasis que las mujeres, el tiempo desde el diagnóstico del melanoma hasta el desarrollo de la metástasis era menor que en las mujeres y la tasa de mortalidad global del melanoma uveal en hombres era mayor que en mujeres.

De manera similar a este estudio, Rietschel et al.¹²⁵ encontraron que el sexo femenino se correlacionaba independientemente con una supervivencia prolongada en los pacientes con melanoma uveal metastásico.

Se han propuesto varias explicaciones para entender las diferencias pronósticas según el sexo del paciente, pero la más probablemente cierta tendría como base un mecanismo hormonal. El efecto directo de los estrógenos y progesterona en el melanoma uveal ha sido evaluado buscando los receptores de estrógenos y progesterona en los tejidos con melanoma uveal primario y metastásico.¹²⁶ Sin embargo, no se han encontrado receptores de estrógenos en el melanoma de la úvea ni en el tejido coroideo normal, lo que sugiere que la actividad de dicho receptor no puede estar implicada en la presentación o crecimiento del melanoma uveal primario.¹²⁷ Se ha comprobado que la administración oral de anticonceptivos orales o estrógenos postmenopáusicos no juegan un papel en la etiología del melanoma uveal.¹²⁶ Existen controversias con respecto al papel del embarazo en la etiología de la enfermedad. Algunos estudios encuentran que incrementa el riesgo de melanoma uveal¹²⁸ mientras que otros afirman que, en realidad, el embarazo reduce el riesgo.¹²⁶ También se encontró que el ambiente hormonal de la mujer no tiene ninguna influencia apreciable en el riesgo de metástasis en las mujeres más jóvenes con melanoma uveal.¹²⁷ No se conocen estudios de los niveles de testosterona en el melanoma uveal. Se puede concluir que los receptores de testosterona

pueden existir en los tumores y dar lugar a un peor pronóstico en los hombres, o que los estrógenos influyan indirectamente en el tejido a través de la regulación de otros factores que afecten directamente al melanoma.²⁷

2.4.2. FACTORES PRONÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS

Valorando detalladamente los aspectos histopatológicos del tumor en casos enucleados, se ha apreciado que los predictores significativos de supervivencia son los siguientes: tipo celular, pleomorfismo nuclear y nucleolar, actividad o índice mitótico, extensión extraocular, patrones de matriz extracelular y vascular, densidad microvascular, invasión vascular e infiltrado celular no neoplásico.

a) Tipo celular

A pesar de las dificultades para asignar con precisión el tipo de célula en algunos casos de melanoma uveal^{9,89,99} la clasificación de Callender modificada por el AFIP ha demostrado tener importancia pronóstica y sigue siendo ampliamente utilizada.⁶⁵ Los melanomas de células fusiformes tienen mejor pronóstico, los melanomas de células epitelioides mal pronóstico y los melanomas de tipo mixto, intermedio.^{69,73}

En una gran serie de 3432 casos de melanoma uveal del cuerpo ciliar y coroides publicada por el AFIP, el 56% de los tumores fueron de tipo mixto. La mortalidad específica por el tumor a los 15 años de los pacientes con melanoma de tipo mixto fue tres veces mayor que la que originaban los melanomas de tipo fusiforme.⁷³

La presencia de células epitelioides se asocia con un peor pronóstico, y los tumores clasificados como melanomas de tipo mixto varían en la proporción de células epitelioides.⁶⁹ El pronóstico empeora con el aumento del número de células epitelioides por campo de gran aumento (CGA), medido como media en 40 CGA. En una serie de 267 pacientes, la mortalidad a los 10 años en tumores con 0,1-0,49 células epitelioides/CGA fue del 14% en comparación con el 70% para tumores con más de 0,5 células epitelioides /CGA.⁸⁷

Algunos autores describen un tipo de célula intermedia que presenta características tanto de una célula fusiforme B como de una célula epitelioide. Sin embargo, ninguno lo especifica como factor pronóstico.^{67,129}

b) Pleomorfismo nuclear y nucleolar

Puesto que la caracterización del tipo celular es bastante subjetiva se han propuesto criterios morfométricos.^{123,130} Gamel et al.¹³⁰ buscaron técnicas más fiables y reproducibles para medir las características citológicas. Estos autores midieron el área, la circunferencia, la anchura y la longitud de los núcleos y nucléolos de las células seleccionados al azar en 50 melanomas uveales. Concluyeron que la medida del tamaño del nucléolo era un mejor predictor de la evolución que la medida del tamaño nuclear y que la desviación estándar era mejor predictor que la media. La característica pronóstica más importante en el melanoma uveal no era la forma de la célula sino el tamaño del nucléolo y su variabilidad.

La desviación estándar del área nucleolar se ha establecido como un marcador del pleomorfismo nucleolar y se demuestra que es pronósticamente significativa.^{130,132} Sin embargo, la medida de este parámetro requiere un equipamiento especializado y precisa bastante tiempo para realizarla. Por ello, se ha acudido a la medida de la media de los diámetros de los 10 nucléolos mayores, como método más rápido y simple y que proporciona similar información pronóstica.¹²³

La media del diámetro de los 10 nucléolos mayores se ha convertido en la medida morfométrica más ampliamente empleada.^{129,133} Una mayor media del diámetro de los 10 nucléolos mayores se ha asociado con una mayor probabilidad de muerte por melanoma uveal.^{123,129,134}

c) Actividad o índice mitótico

El recuento de mitosis por número específico de CGA está ampliamente aceptado y se correlaciona estrechamente con el riesgo de muerte por metástasis.^{135,136} La actividad mitótica, determinada por el número de mitosis observadas por CGA, ha

demostrado tener valor pronóstico en algunos estudios.^{91,137,138} En uno de ellos, realizado sobre 217 melanomas uveales del AFIP, McLean et al.,⁹⁵ observaron que la actividad mitótica tumoral se correlacionaba con la mortalidad. La actividad mitótica se determinó contando el número de mitosis en 40 CGA. El porcentaje de casos mortales aumentaba progresivamente con el incremento del número de mitosis por CGA. Los tumores con baja actividad mitótica (0-1 mitosis /40 CGA) tenían buen pronóstico, con una mortalidad a los seis años del 15%, comparada con el 56% de mortalidad que se advertía en tumores con elevada actividad mitótica (9-48 mitosis /40 CGA). La mortalidad a los seis años en tumores con actividad mitótica media (2-8 mitosis /40 CGA) fue del 43%. Esta correlación era independiente del tamaño tumoral. Sin embargo, en determinadas publicaciones existen algunos problemas metodológicos importantes. En primer lugar, el uso de campos de gran aumento sin especificar introduce una notable variabilidad subjetiva y confunde las comparaciones de resultados entre centros, ya que “los campos de gran aumento” son áreas diferentes en los distintos microscopios.¹³⁹ Segundo, muchas publicaciones no justifican el por qué se seleccionan 40 campos. Por último, no es frecuente que las publicaciones especifiquen donde deben ser evaluadas las figuras mitóticas en el tumor. El número de mitosis en un tumor varía dependiendo de si la evaluación se realiza en el centro o en la periferia del tumor.⁹

Otros investigadores han confirmado el valor pronóstico del recuento del número de figuras mitóticas en 40 CGA.^{87,140,141} Sin embargo, en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, puede ser difícil reconocer las figuras mitóticas o diferenciarlas de ocasionales cuerpos apoptóticos, particularmente en áreas de necrosis. Las células en división pueden identificarse mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo denominado PHH3 (Phospho-histona 3) o Ser-10. Sin embargo, la tinción con este anticuerpo pierde intensidad con el tiempo y se emplea en muy pocos centros.¹⁴² Sólo aquellas células que estén en mitosis inequívocamente se aceptarán para el recuento. Un exacto índice mitótico requiere un tiempo considerable y está influenciado por la experiencia y agilidad del patólogo que realiza el recuento. Cuando se evalúa el número de mitosis por CGA, se debería dar el área del CGA, y según algunos autores, preferiblemente el número de mitosis por 1000 células.¹³⁸

d) Extensión extraocular

La presencia de extensión extraocular se observa en aproximadamente el 13% de los ojos enucleados por melanoma uveal (*Fig.26*).^{40,87,143} Existen varias vías de extensión escleral posibles, que incluyen: 1) los canales de drenaje del acuoso del canal de Schlemm, 2) arterias ciliares anteriores y posteriores, 3) venas vorticosas, 4) nervios ciliares cortos y largos, 5) nervio óptico, y 6) perforación escleral directa.¹³⁵

Se ha sugerido que la extensión extraocular es más probable cuando el tumor intraocular está avanzado y que se asocia con características histológicas de mayor malignidad (por ejemplo, célula de tipo epitelióide).¹⁴³ Sin embargo, tales hipótesis se basan en el estudio de la extensión extraocular sin tener en cuenta las vías esclerales de extensión.

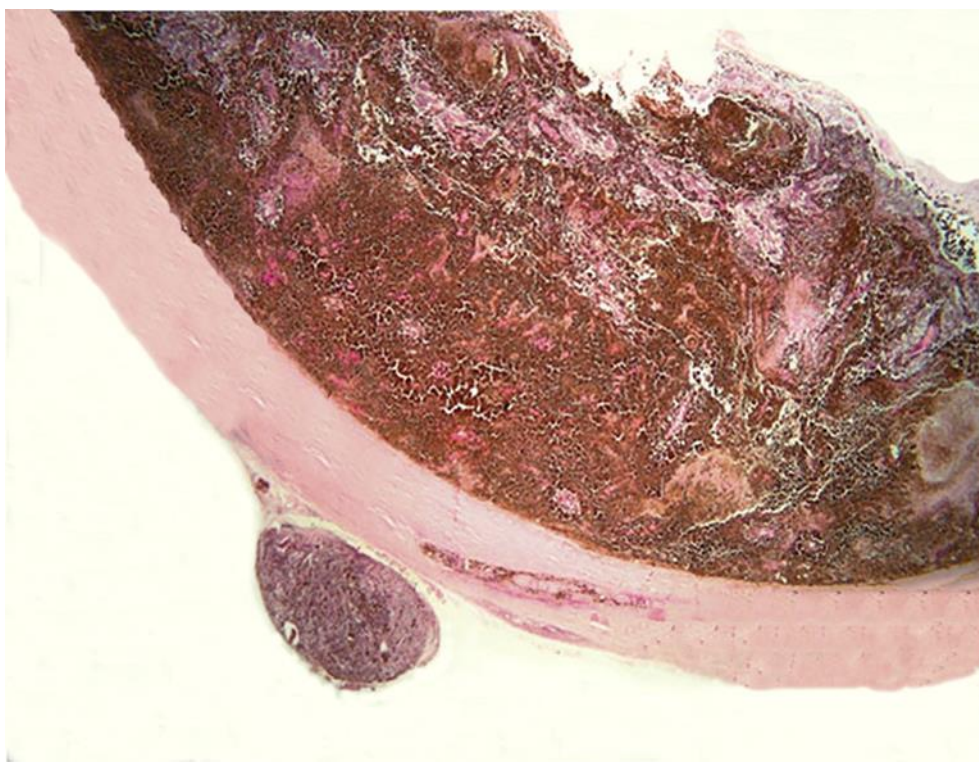


Figura 26. Melanoma de coroides con extensión extraocular (HE, 2x).

Varios estudios han demostrado que la extensión extraocular denota un peor pronóstico de supervivencia.^{30,143} En un estudio de 267 melanomas de coroides y cuerpo ciliar, con un tiempo de seguimiento medio de 17 años, la mortalidad a los diez años se duplicó al 75% en los casos en que existía infiltración transescleral.⁸⁷ La mortalidad se incrementaba en aquellos pacientes con extensión tumoral extraocular en los que el margen tumoral se seccionaba quirúrgicamente o no estaba encapsulado.¹⁴³ Algunos autores suponían que la presencia de tumor extraocular en sí mismo era lo que incrementaba la mortalidad.³⁰ Sin embargo, otras publicaciones atribuyen esta asociación a una correlación entre la extensión extraocular y el incremento de malignidad del tumor intraocular.¹⁴³

Zografos sugirió que la extensión extraocular se correlacionaba con una reducción de la supervivencia sólo si la extensión tumoral transescleral ocurría a través de las venas vorticosas; sin embargo, en este estudio no se consideraron factores predictivos histológicos.¹³⁵

Para subsanar las deficiencias de la literatura publicada, Coupland et al.¹³⁵ investigaron la correlación entre las vías de extensión extraocular y otros factores predictivos en una gran serie de pacientes con datos clínicos, histológicos y citogenéticos detallados. Además, estudiaron la relación entre la muerte metastásica y la presencia de extensión extraocular, teniendo en cuenta la vía y el tamaño del tumor extraocular. Los principales hallazgos de este estudio fueron que la extensión extraocular más frecuente se llevaba a cabo a través de los canales de drenaje del acuoso, ocurriendo en el 15% de los tumores que afectaban al cuerpo ciliar o ángulo. La extensión extraocular se asociaba con el tamaño y localización tumoral. Además se correlacionaba con las características histológicas y citogenéticas de malignidad tumoral. Todas las vías de extensión extraocular se correlacionaron de manera similar con la muerte metastásica. Este resultado difiere significativamente de las conclusiones de Zografos, que como hemos comentado previamente, publicó que sólo la extensión extraocular a través de las venas vorticosas predecían un aumento de la mortalidad metastásica. El tamaño del tumor extraocular no se correlacionó significativamente con la mortalidad. En cambio, otros autores han sugerido que el mayor tamaño del tumor extraocular se asociaba con un incremento de la tasa de recurrencia orbitaria y con un

peor pronóstico, aunque esto último no se ha demostrado que sea estadísticamente significativo en un análisis multivariante.¹⁴³ En resumen, la extensión extraocular se correlacionó con un aumento de la mortalidad ya que se asoció con un incremento de la malignidad tumoral y, en caso de tumores posteriores, con un estadio más avanzado de la enfermedad. Las vías de extensión extraocular reflejaban solamente la localización y la extensión del tumor intraocular y era relativamente poco importante con respecto al pronóstico de supervivencia.¹³⁵

Actualmente, no está claro si la extensión extraocular contribuye al riesgo de metástasis o si sólo es un indicador de mayor malignidad tumoral.¹³⁶

Raoof et al.¹⁴⁴ encontraron afectación microscópica de las venas vorticosas en 29 de 244 (11,9%) melanomas uveales. La invasión de las venas vorticosas se correlacionaba con características pronósticas adversas tales como el tamaño tumoral grande, las asas y redes de matriz extracelular, las alteraciones genéticas asociadas con peor pronóstico y las metástasis hepáticas.

La invasión del nervio óptico en el melanoma uveal no es tan frecuente como en el retinoblastoma. El melanoma uveal infiltra el nervio óptico en el 0,6% - 5% de los pacientes y se ha asociado con la presión intraocular alta, el tipo de célula no fusiforme, la localización yuxtapapilar y la ceguera.¹⁴⁵ La invasión normalmente se limita al tejido nervioso anterior a la lámina cribosa, aunque se han publicado casos de extensión al quiasma óptico y cerebro.¹⁴⁶

Dependiendo del grado de invasión podemos distinguir dos tipos de invasión del nervio óptico:^{146,147}

- ❖ Invasión prelaminar/laminar, definida como la presencia de células tumorales en la cabeza del nervio óptico y/o lámina cribosa.
- ❖ Invasión postlaminar, cuando las células tumorales están presentes en el nervio óptico y/o en las envolturas meníngeas más allá de la lámina cribosa en sentido centrípeto.

Lindegaard et al.¹⁴⁶ llevaron a cabo un estudio en el que revisaron 157 casos de melanomas uveales con infiltración del nervio óptico. Estos autores llegaron a la conclusión de que la invasión del nervio óptico se asociaba con peor pronóstico debido al tamaño tumoral grande y la alta tasa de recurrencia orbitaria (ya que la probabilidad de una extirpación total del tumor es menor si el tumor se extiende al nervio óptico, sobre todo, sino se sospecha que pueda existir dicha invasión previamente a la enucleación).

Parece que existen dos categorías de melanomas uveales con invasión del nervio óptico. La mayoría de los casos son tumores grandes que infiltran el nervio óptico por simple proximidad entre el tumor y el nervio óptico. Al crecer el tumor, infiltran los tejidos circundantes incluyendo al nervio óptico. Sin embargo, existe una subcategoría de melanomas uveales neurotróficos con un patrón de crecimiento invasivo difuso. Estos tumores se extienden a la retina y nervio óptico independientemente del tamaño tumoral y proximidad al nervio óptico.^{146,147} Se han publicado casos de melanomas con extensión postlamina que conseguían alcanzar el nervio óptico tras la siembra tumoral en la cavidad vítrea y posterior adhesión de células tumorales viables a la cabeza del nervio óptico. Esta extensión así como el crecimiento de las células tumorales a lo largo de la membrana limitante interna de la retina también ha sido descrita por otros autores.^{147,148}

e) Patrones de matriz extracelular y vascular

Como hemos referido anteriormente, debido a la ausencia de un sistema linfático intraocular, los melanomas uveales únicamente pueden metastatizar por vía sanguínea, a menos que muestre extensión extraocular con invasión de los linfáticos conjuntivales. Es por ello que la presencia de patrones vasculares en el tumor ha despertado un enorme interés entre los investigadores. Folbert et al.¹⁴⁹ fueron los primeros en documentar la existencia de distintos patrones microvasculares en los melanomas de úvea. Desde entonces, su histogénesis, naturaleza y función han sido motivo de estudio y controversia entre los investigadores.¹⁵⁰ Aparecen como canales tridimensionales de aspecto vascular, que transportan plasma y a veces, sangre, pero que no están delimitados por células endoteliales (mimetismo vasculogénico) sino por componentes

de la membrana basal. Son estructuras compuestas básicamente por matriz extravascular.¹⁵¹ Varios estudios in vitro han demostrado como las propias células del melanoma uveal son las responsables de estimular la formación de estos canales a través de los cuales se ha logrado inyectar distintas sustancias de contraste.¹⁵² Para su identificación se han utilizado varias técnicas (fluoresceína conjugada Ulex europeaeus agglutinin I, tinción azan). La más utilizada es la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) sin contratinción con hematoxilina que reacciona con las membranas basales periendoteliales.^{149,153}

En 1992, Folbert et al.¹⁴⁹ introdujeron un sistema para evaluar los patrones vasculares en los melanomas uveales primarios utilizando cortes histológicos teñidos con PAS y encontraron que ciertas variantes se correlacionaban con la supervivencia. Describieron nueve subtipos de patrones vasculares (arquitectura de la microcirculación) observados con un objetivo de 10x:

- ❖ Patrón normal, donde las células tumorales crecen alrededor de los vasos coroideos normales, que pueden estar llenos de sangre o vacíos, sin comprimirlos.
- ❖ Patrón silente (ausente, zonas de avascularización), en el que no se identifican vasos normales ni vasos nuevos tumorales.
- ❖ Patrón recto, con vasos rectos distribuidos aleatoriamente que carecen de ramificaciones dicotómicas y que no están relacionados entre sí.
- ❖ Patrón paralelo, con vasos rectos orientados paralelamente sin ramificaciones dicotómicas ni entrecruzamientos, es un patrón similar al anteriormente descrito pero con los vasos en paralelo entre sí.
- ❖ Patrón paralelo con entrecruzamiento, donde los vasos están orientados paralelamente y con entrecruzamientos entre ellos.
- ❖ Arcos, fragmentos de vasos curvados o asas incompletamente cerradas (estructuras circulares incompletas o no cerradas).

- ❖ Arcos con ramificaciones, donde los arcos muestran ramificaciones dicotómicas.
- ❖ Asa, un lóbulo o islote del tumor rodeado completamente por un asa vascular larga y cerrada. Únicamente se requiere un asa vascular completa para definir este patrón.
- ❖ Redes, que representan asas cerradas “back to back”, y están compuestas por al menos tres asas interconectadas.

La mayoría de los tumores exhiben una mezcla de estos patrones expuestos, es decir, presentan una distribución vascular heterogénea, intercalándose, por ejemplo, áreas de relativo “silencio vascular” con áreas donde abundan estas formaciones.¹⁵⁴

Folbert et al.,¹⁴⁹ tras un estudio preliminar caso-control pareado de 40 casos de melanomas uveales señalaron que la presencia de al menos un asa vascular cerrada era el patrón más importante asociado con la muerte por metástasis de melanoma tras la enucleación. Un estudio posterior, con mayor tiempo de seguimiento, realizado por el mismo grupo de autores analizó en 234 casos de melanoma uveal los diferentes patrones vasculares. El modelo de Cox demostró que la presencia de redes vasculares, definidas como al menos tres asas cerradas “back to back”, era la característica más fuertemente asociada con la muerte por enfermedad metastásica. La supervivencia estimada a los 10 años para tumores sin redes vasculares fue del 90%, y la presencia de redes significativamente reducía la supervivencia al 50%.¹⁵⁴ La presencia de este patrón debería ser registrado en los informes anatomopatológicos. Estudios posteriores apoyan estas conclusiones.^{153,156}

McLean et al.¹⁵⁷ posteriormente, simplificaron la clasificación de los patrones vasculares propuesta por Folbert. Utilizaron únicamente tres categorías – presencia de asas, presencia de dudosas asas y ausencia de asas- y encontraron que la presencia de asas vasculares se asociaba significativamente con la muerte relacionada con el tumor tanto en el análisis univariante como multivariante.

Una de las hipótesis que ha suscitado interés a la hora de explicar la presencia de los patrones de microvascularización asociados a un peor pronóstico es que funcionan como alternativa a la clásica angiogénesis favoreciendo el crecimiento tumoral y la siembra metastásica, que en el caso del melanoma uveal, como ya se ha comentado, sólo puede producirse por vía hemática.¹⁵⁰

Los patrones vasculares identificados en los cortes histológicos teñidos con PAS difieren de los observados en los cortes teñidos con marcadores vasculares. El examen cuidadoso de los patrones teñidos con PAS parece demostrar no sólo los vasos verdaderos, sino también los septos de tejido conectivo alrededor de los vasos y patrones de matriz extracelular no relacionados con los vasos dispuestos alrededor de los islotes tumorales. Fost et al.¹⁵⁸ reconsideraron este tema tiñendo cortes histológicos de melanoma uveal con PAS y factor VIII. Estos autores demostraron diferentes patrones para estos dos marcadores: el factor VIII no detectaba los patrones de mayor importancia pronóstica, las asas y redes vasculares, que si se demostraban con PAS. Sugirieron que los patrones teñidos con PAS se basaban en el tejido fibrovascular y que estos patrones reflejaban el crecimiento tumoral desordenado y la aparición de subclonas de rápido crecimiento que se correlacionan con la supervivencia.

f) Densidad microvascular

El crecimiento, progresión y metástasis del cáncer dependen del adecuado aporte sanguíneo y, por lo tanto, de la vascularización. La alta densidad microvascular, una medida morfológica ampliamente utilizada, predice independientemente la muerte de varios tipos de cáncer.¹⁵⁹

La densidad microvascular se mide contando el número de vasos sanguíneos por unidad de área en las zonas más vascularizadas del tumor (“hot spots”). Para identificar estos vasos se emplean anticuerpos anti-endoteliales como por ejemplo anticuerpos anti-CD34.¹³⁶

Foss et al.¹⁶⁰ demostraron la correlación entre la densidad vascular y el pronóstico en 123 melanomas uveales teñidos inmunohistoquímicamente con factor VIII. Los recuentos de la microvasculatura se realizaron en zonas de mayor densidad

vascular y en un área de 0,25 mm. Estos autores concluyeron que la densidad microvascular era un factor pronóstico para la supervivencia en pacientes con melanoma uveal en un análisis univariante.

Otros autores utilizando diferentes marcadores vasculares para realzar los vasos han demostrado resultados contradictorios tales como Lane et al.¹⁶¹ que marcaron los vasos empleando el anticuerpo *Ulex europeaeus* agglutinin I, y contaron los microvasos en diferentes áreas del tumor (ápex, centro y base). Los hallazgos de este estudio sugirieron que no existía correlación entre la densidad microvascular y la tasa de metástasis. El pequeño número de pacientes en este estudio y la manera de seleccionar las áreas para ser evaluadas pudieron haber contribuido a estos resultados negativos.

Mäkitie et al.¹⁵⁹ analizaron los patrones vasculares y la densidad microvascular utilizando anticuerpos anti-CD34, factor VIII y α -actina de músculo liso. Los vasos se contaron en áreas de 0,313 mm² de mayor densidad. El recuento microvascular basado en la tinción con CD34 y factor VIII (pero no con α -actina de músculo liso) mostraron una correlación significativa con el pronóstico. Encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la alta densidad microvascular y la presencia de asas microvasculares y redes, la presencia de células epitelioides, y el diámetro tumoral basal mayor.

Algunos investigadores han sugerido que las células del melanoma agresivas pueden expresar el epítipo CD34 a diferencia de las células tumorales no agresivas. Por consiguiente, la densidad microvascular en el melanoma uveal puede reflejar la angiogénesis tumoral, la agresividad o ambas.¹⁶²

g) Invasión vascular

La invasión de las células tumorales en los vasos sanguíneos es esencial para las metástasis en el melanoma uveal. Sin embargo, hay sólo un número limitado de estudios referentes a la invasión vascular en el melanoma uveal.¹³⁵

Un reciente estudio realizado por Ly et al.¹⁶³ sobre 643 melanomas uveales demostró que la presencia de tumor intravascular se asociaba con un peor pronóstico. La presencia de invasión vascular se correlacionaba significativamente con el diámetro tumoral, la presencia de células no fusiformes y el crecimiento intraescleral. Sin embargo, el crecimiento intravascular era sólo un factor pronóstico independiente cuando los patrones de matriz extracelular no se añadían en el grupo de parámetros analizados. El significado y la posible utilidad de estos hallazgos aún no se han establecido.

h) Infiltrado celular no neoplásico

La infiltración leucocitaria es una característica común de los cánceres en humanos, incluyendo aquellos que se desarrollan en sitios inmunoprivilegiados, tales como el ojo.^{164,165} Durante años, se supuso que las células inflamatorias en los cánceres reflejaban una respuesta antitumoral. Sin embargo, gracias a los avances en la identificación de los diferentes subtipos celulares, existe una evidencia creciente de que la inflamación juega un papel importante en la fase de iniciación del tumor además de influir en la progresión tumoral.¹⁶⁵

En el melanoma uveal, un fenotipo inflamatorio que incluye una presencia aumentada de tipos diferentes de linfocitos y macrófagos junto con un incremento de la expresión de HLA de clase I y II se asocia con un peor pronóstico (pérdida de un cromosoma 3).¹⁶⁶

Este tema se tratará con mayor profundidad en el apartado correspondiente al microambiente inflamatorio en el melanoma uveal.

2.4.3. FACTORES PRONÓSTICOS CITOLÓGICOS

a) Proliferación celular

Se han utilizado diferentes técnicas para valorar la actividad proliferativa del melanoma uveal, tales como: la visualización de las regiones organizadoras nucleolares

(condensaciones del DNA nucleolar) mediante tinciones argénticas, la determinación de aneuploidía tras la cuantificación del ADN celular por citometría de flujo y la tinción inmunohistoquímica de algunos epítomos como el Ki-67 y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA).

a.1) Regiones organizadoras nucleolares

Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) son segmentos de DNA que codifican el RNA ribosómico, el cual está directamente relacionado con la síntesis proteica y la proliferación celular. Mediante técnicas de impregnación argéntica se pueden detectar las proteínas asociadas a los NORs, denominándose entonces regiones organizadoras nucleolares argirofilas (AgNORs), siendo su cantidad proporcional a la actividad proliferativa. Las AgNORs se visualizan fácilmente como puntos negros localizados exclusivamente por todo el área nucleolar. La tinción argéntica de las NORs, es un método objetivo para evaluar la malignidad de gran variedad de tumores. Aunque no es una técnica compleja ni cara, requiere mucho tiempo.^{81,129,138}

Tuccari et al.¹⁶⁷ llevaron a cabo la cuantificación de AgNORs en 34 melanomas de coroides. Mediante el análisis multivariante de Cox, la cantidad de AgNORs parecía la única variable pronóstica independiente para predecir la evolución final de los pacientes.

a.2) Aneuploidía

El contenido de ADN y ARN de las células puede ser valorado mediante citometría de flujo. Las células normales tienen un número $2n$ de cromosomas, es decir, son diploides. Un número anormal de cromosomas, característico de células tumorales, se denomina aneuploidía y refleja cambios en el contenido de ADN.⁸¹

La aneuploidía en el melanoma uveal se ha correlacionado con la presencia de células epitelioides. Las anomalías en la ploidía probablemente reflejan una población celular genéticamente inestable que tiene una mayor capacidad para metastatizar.¹⁶⁸ Las anomalías en la ploidía en el melanoma uveal se han correlacionado más estrechamente

con la supervivencia que los parámetros histopatológicos convencionales.^{169,170} Sin embargo, existen estudios que han demostrado que la ploidía de ADN del melanoma uveal, no es un predictor de supervivencia estadísticamente significativo.^{171,172}

a.3) Expresión de Ki-67 y PCNA

Las células del melanoma uveal expresan una serie de antígenos asociados al melanoma, que pueden ser detectados mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos monoclonales.¹³⁷ Los dos antígenos más conocidos como marcadores específicos de proliferación celular son el Ki-67 y el PCNA, que se expresan cuando las células están en fase proliferativa.¹⁷³

El antígeno nuclear Ki-67 se expresa en todas las fases del ciclo celular no-G₀, es decir, en G₁, S, G₂, y mitosis.¹⁷⁴ Mooy et al.¹³⁷ estudiaron retrospectivamente el índice de Ki-67 en 51 melanomas uveales y compararon su significado pronóstico con indicadores de pronóstico establecidos tales como el tipo celular y el tamaño tumoral. Estos autores emplearon el anticuerpo monoclonal MIB-1 que reconocía el antígeno Ki-67. El análisis multivariante demostró que el índice de Ki-67 era un parámetro pronóstico independiente. Además, parecía existir cierta correlación entre el índice de Ki-67 y la presencia de células de tipo epitelioides y de apoptosis.

Chowers et al.¹⁷⁵ evaluaron la actividad proliferativa en 98 melanomas uveales mediante inmunotinción con el anticuerpo MIB-1. Se calculó la media del número de células MIB-1 positivas por CGA en 10 CGA (40x) en el área de inmunoreactividad máxima. La actividad proliferativa estimada por la media del número de células MIB-1 positivas por CGA fue significativamente mayor en los melanomas del cuerpo ciliar que en los melanomas de coroides e iris. Los melanomas de iris se caracterizaban por una menor tasa de proliferación. En otro estudio, un alto número de células teñidas con Ki-67 se correlacionó con tumores grandes y tumores de células epitelioides predominantemente. Un alto porcentaje de células Ki-67 positivas ($\geq 6,5\%$) se asoció también con una menor supervivencia.¹⁷⁶

El PCNA se expresa durante la última fase de G₁, y en las fases S, G₂ y M del ciclo celular. El valor pronóstico del PCNA en el melanoma uveal se analizó en una serie de 212 pacientes con melanomas de coroides y cuerpo ciliar. Empleando el anticuerpo monoclonal PC-10, que detectaba un epítipo en el PCNA, se observó que la tasa de supervivencia acumulada a los 10 años fue del 84% en los pacientes con melanomas que presentaban baja inmunorreactividad para el anticuerpo PC-10 y del 40% en los pacientes con tumores altamente positivos. Los pacientes con tumores altamente positivos tenían un riesgo relativo 5,8 veces mayor de morir por enfermedad metastásica.¹⁷⁷ La actividad proliferativa del melanoma uveal se reduce tras la irradiación tal y como ha sido demostrado al valorar la expresión del Ki-67¹⁷⁶ y del PCNA.¹⁷⁹

Aunque el Ki-67 es un sólido marcador inmunohistoquímico, el PCNA es propenso a una alta tinción de fondo, y es sensible al método de fijación y de procesamiento del tejido.⁹ Además, no hay una manera uniforme de contar las células positivas y de preparar las muestras por lo que los resultados de los diferentes centros varían considerablemente.^{173,178,180}

b) Antígenos de histocompatibilidad

Otro importante parámetro relacionado con el pronóstico incluye los determinantes inmunológicos como la expresión de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), que pueden valorarse empleando métodos inmunohistoquímicos.¹⁸¹⁻¹⁸⁵ La expresión de antígenos HLA de clase I puede desempeñar un doble papel en relación con el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune: mientras que el reconocimiento de las células tumorales por las células T citotóxicas necesita la expresión de moléculas HLA de clase I, la presencia de estas moléculas desactivan a las células natural killer (NK). Por lo tanto, los cambios en la expresión de las moléculas de clase I es probable que tengan un efecto directo en la susceptibilidad de las células tumorales a la lisis por las células T citotóxicas o las células NK.¹⁸⁰ Las células tumorales que dejan de expresar las correspondientes moléculas HLA de clase I pueden, en primer lugar, escapar de la lisis mediada por las células T citotóxicas y, de ese modo, facilitar aún más el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Por otro lado, la

pérdida de ciertas moléculas HLA de clase I hacen a las células tumorales más sensibles a la lisis mediada por las células natural killer (NK).¹⁸³

Aunque en la oncología general, la disminución de la expresión de los antígenos HLA se considera un importante mecanismo de escape tumoral, investigadores han publicado en varios estudios que, en el melanoma uveal, una alta expresión de HLA se asocia con un pronóstico desfavorable.^{181-183,186} Según de Ward-Siebinga et al.¹⁸⁶ la expresión aumentada de HLA de la clase I y de la clase II conllevaba un pronóstico desfavorable, ocurría con mayor frecuencia en tumores epitelioides y se asociaba con un número incrementado de linfocitos T CD3+ y CD4+. Blom et al.¹⁸¹ observaron que los pacientes con baja expresión de HLA-A o HLA-B tenían una supervivencia significativamente mejor que los pacientes con una alta expresión. Ericsson et al.¹⁸⁰ demostraron similares hallazgos que Bloom et al.¹⁸¹ ya que una baja expresión se correlacionó con una tasa de metástasis significativamente más baja y una mejor supervivencia.

Dependiendo de la vía de metástasis (es decir, vía hematógica o linfática), pueden predominar las células NK versus células T como mecanismo de vigilancia inmune. Debido a que el melanoma uveal se extiende específicamente vía hematógica, se sugiere un efecto predominante de la lisis de las células tumorales mediada por las células NK. En cambio, en tumores que se extiendan vía linfática las células NK puedan jugar un papel menos importante. Por ello, los pacientes con melanoma uveal con pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I mostraron una supervivencia mejor que los pacientes con una alta expresión de estos antígenos.¹⁸³

2.4.4.- FACTORES PRONÓSTICOS GENÉTICOS

El análisis del perfil genético del melanoma uveal tiene la capacidad de proporcionar información pronóstica, por ejemplo, determinar si un tumor metastatizará. Sin embargo, los resultados de los ensayos genéticos dependen de la calidad del material sometido al estudio; los errores o fallos en la detección de alteraciones puede ocurrir debido a las muestras de mala calidad, por ejemplo, aquellas con bajo número de células tumorales, tumor necrótico o pobremente preservado.¹⁸⁷ La heterogeneidad

tumoral también puede afectar los resultados del estudio genético.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Recientes estudios en otros tumores han demostrado que éstos se componen de múltiples clonas diferentes que pueden estar separadas espacialmente en el tumor. Algunas de estas clonas tienen la capacidad de metastatizar (y albergan las alteraciones genéticas adversas correspondientes), mientras que otras no. Como consecuencia, el análisis de una muestra pequeña de un tumor puede no incluir una clona con potencial metastásico, dando lugar a un falso positivo (es decir, “pronóstico favorable”). Esta es una importante salvedad cuando se emplean ensayos genéticos para estimar el pronóstico.¹⁸⁷

a) Factores pronósticos citogenéticos

Las investigaciones citogenéticas en el melanoma uveal comenzaron a comienzos de los años 90 con el cariotipo estándar. Las primeras alteraciones genéticas publicadas en el melanoma uveal afectaban a los cromosomas 1, 3, 6 y 8.^{191,192} En 1992, Horthemke et al.¹⁹³ y Prescher et al.¹⁹⁴ propusieron que las alteraciones en los cromosomas 3 y 8 explicaban las diferencias en la supervivencia de los pacientes con melanoma uveal. En 1996, Prescher et al.¹⁹⁵ confirmaron sus resultados en una serie de 54 melanomas uveales tratados mediante enucleación en los que la monosomía del cromosoma 3 (pérdida completa de una de las dos copias de dicho cromosoma) se detectó en 30 pacientes (56%). A los tres años de seguimiento, el 57% de los pacientes con monosomía 3 desarrollaron metástasis mientras que ninguno de los pacientes con disomía 3 desarrolló enfermedad metastásica. En 1997, Sisley et al.¹⁹⁶ publicaron resultados similares en una serie de 42 tumores utilizando técnicas de cariotipo estándar. La monosomía 3 se detectó en el 50% y la duplicación del cromosoma 8q en el 54% de los casos.

La monosomía del cromosoma 3 es la alteración cromosómica no aleatoria más frecuente en el melanoma uveal (50-60% de los casos) y se encuentra predominantemente en tumores que metastatizan.^{195,197-200} La monosomía 3 parece bastante específica del melanoma uveal ya que esta alteración cromosómica rara vez se encuentra en el melanoma cutáneo u otros tipos de cáncer.²⁰¹ En la mayoría de los casos, se pierde una copia completa de este cromosoma, aunque en algunos casos se adquiere una isodisomía del cromosoma 3 (en la que ambas copias del mismo cromosoma

proceden del mismo progenitor).²⁰² La isodisomía del cromosoma 3 parece ser equivalente a la monosomía 3 desde el punto de vista pronóstico.¹⁹⁸ La monosomía del cromosoma 3 se correlaciona fuertemente con un peor pronóstico.²⁰³⁻²⁰⁵ Esta asociación se hace incluso más fuerte cuando coexisten las pérdidas del cromosoma 3 y del cromosoma 1p36.²⁰⁶ Se cree ampliamente que el cromosoma 3 alberga genes supresores de tumores que juegan un papel importante en el desarrollo del melanoma uveal. La pérdida parcial del cromosoma 3 se ha asociado con un pronóstico significativamente mejor que la pérdida de una copia completa del cromosoma 3.²⁰⁶ La aparición de un isocromosoma (cromosoma que ha perdido un brazo y el otro se ha duplicado) 8q (i8q) en un 45% de los casos coincide con la monosomía 3. Además el 82% de los melanomas uveales con monosomía 3 muestran multiplicación del isocromosoma 8q. La monosomía 3 y el i8q se correlacionan con la localización en el cuerpo ciliar y con el fenotipo epitelioides.⁹ La ganancia del 8q se encuentra en aproximadamente el 40% de los melanomas uveales y la pérdida del 8p en aproximadamente el 25%.⁹¹

Las alteraciones en el cromosoma 6, a menudo, se presentan como pérdidas de 6q o ganancias de 6p, ocurriendo en aproximadamente el 40% de los melanomas uveales. Estas alteraciones pueden ocurrir independientemente de las alteraciones en los cromosomas 3 y 8. Generalmente se asocia con el melanoma coroideo. La relación con el pronóstico es bastante compleja y sigue siendo incierta. Según Damato et al.²⁰⁸ la ganancia del cromosoma 6p se asocia con un pronóstico relativamente bueno sugiriendo que es debido a que la monosomía 3 es menos frecuente en tumores con ganancia del cromosoma 6p. Además, cuando ambas alteraciones cromosómicas ocurren a la vez, la supervivencia es mejor que con la monosomía 3 únicamente.

Un reordenamiento del cromosoma 1 es menos frecuente que las otras alteraciones citogenéticas, pero se encuentran en aproximadamente el 25-30% de los melanomas uveales posteriores. La principal alteración es una delección o reordenamiento del 1p que se identifica con mayor frecuencia en los melanomas del cuerpo ciliar. La relación con el pronóstico no está clara. El reordenamiento 1p se encuentra con más frecuencia en grandes melanomas y en melanomas uveales que han metastatizado, sugiriendo un peor pronóstico.^{9,90} En el melanoma uveal también se han

detectado alteraciones en otros cromosomas. Sin embargo, han llevado a resultados contradictorios con respecto al impacto pronóstico.¹⁸⁹

Las alteraciones cromosómicas se pueden detectar utilizando técnicas como la hibridación in situ con fluorescencia (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization), la hibridación genómica comparativa (CGH: Comparative Genomic Hybridization), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction), la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), entre otras.¹⁸⁷

La hibridación in situ con fluorescencia implica el apareamiento preciso de una sonda de DNA marcada por fluorescencia con secuencias dianas complementarias. La hibridación de la sonda es visible por detección directa utilizando un microscopio de fluorescencia. En general, se usan tres tipos básicos de sondas de DNA:²⁰⁹⁻²¹²

- ❖ Centroméricas o sondas de enumeración cromosómica (CEPs: Chromosome enumeration probes). Son sondas cromosomo-específica formadas por una secuencia repetitiva de ADN que hibrida con el ADN de la región centromérica del cromosoma.
- ❖ Sondas para cromosomas completos o sondas de pintado cromosómico. Formadas por una batería de sondas que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma.
- ❖ Sondas específicas de locus. Hibridan con el ADN de una región genómica concreta.

En resumen, diferentes estudios han confirmado la fuerte asociación entre la monosomía 3 y la corta supervivencia. También se ha demostrado que las metástasis en ausencia de monosomía 3 son muy raras. Basados en estos hallazgos, la monosomía 3 actualmente se está utilizando en muchos centros como un marcador pronóstico para identificar el melanoma uveal agresivo. La FISH es una técnica fiable para la evaluación de las alteraciones cromosómicas en el melanoma uveal. Muchos centros de referencia emplean de rutina la FISH para el análisis del estado del cromosoma 3.

b) Factores pronósticos moleculares**b.1) Perfil de expresión génica**

En 2004, Onken et al.²¹³ emplearon el perfil de expresión génica para clasificar a los melanomas uveales en dos grupos de significado pronóstico: clase 1 (tumores con riesgo relativamente bajo de metástasis) y clase 2 (con alto riesgo de desarrollar enfermedad metastásica). Estos autores publicaron una supervivencia a los ocho años del 95% para los pacientes del grupo 1 y del 31% para los del grupo 2. Varios estudios posteriores han demostrado el valor pronóstico de este estudio.²¹⁴⁻²¹⁶ Un gran estudio colaborativo de 459 pacientes procedentes de 12 centros médicos encontró una fuerte asociación entre el perfil de expresión génica de la clase 2 y otros factores pronósticos adversos como la edad avanzada, la afectación del cuerpo ciliar, la dimensión tumoral mayor y el espesor, el tipo de célula epitelioides, y la monosomía 3. En el análisis multivariante, ninguna combinación con otras variables pronósticas (incluyendo el estado del cromosoma 3) se asoció más estrechamente con las metástasis que el perfil de expresión sólo.²¹⁷

b.2) BAP1 (BRCA1-associated protein 1)

Recientemente se ha demostrado que las mutaciones del gen BAP1 (que se traducen en una inactivación funcional de dicho gen) se asocian con un incremento del riesgo de metástasis en pacientes con melanoma uveal. Por ello, la evaluación del estado de BAP1 puede ser un método útil para identificar a los pacientes que son más propensos a desarrollar metástasis.^{187,218} Recientes estudios han demostrado una excelente correlación entre la mutación del gen BAP1 y la pérdida de expresión nuclear de BAP1 determinada mediante inmunohistoquímica.^{219,220} Koopmans et al.²²⁰ (2014) han demostrado esta fuerte asociación entre la tinción inmunohistoquímica de BAP1 y el estado mutacional con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97%. Dado el elevado coste que supone el análisis mutacional de BAP1, la inmunohistoquímica ofrece una alternativa rápida y económica que puede servir como método de screening de pacientes con melanoma uveal agresivo.

b.3) Expresión de ciclina D1, p53 y MDM2

El valor pronóstico de la expresión de proteínas tales como ciclina D1, p53 y MDM2 se investigó en 96 casos de melanoma uveal. El estudio demostró que la inmunorreacción positiva del tumor para la ciclina D1 y p53 (definida como el 15% de los núcleos tumorales positivos para ciclina D1 y p53) se asociaba con una evolución desfavorable. La inmunorreacción positiva a ciclina D1 se relacionó además con la extensión extraocular, melanomas de células epitelioides o de tipo mixto y MIB-1 positivo. MDM2 se correlacionó con una mala evolución clínica. Sin embargo, este estudio plantea varias cuestiones. El número de casos es pequeño, no explican la razón de tomar el límite del 15% como inmunorreacción positiva. Además, la interpretación de los resultados de la inmunohistoquímica para p53 es difícil, con numerosos problemas relacionados con la fijación, los diferentes anticuerpos y las diferentes técnicas de recuperación antigénica. Se requiere un gran estudio con criterios estrictos estandarizados para evaluar si estos factores tienen verdaderamente significado pronóstico.²²¹

b.4) Expresión de c-myc

La sobreexpresión de c-myc se ha identificado en el melanoma uveal utilizando la citometría de flujo²²² y la inmunohistoquímica.^{168,223} Todos los estudios basados en la inmunohistoquímica sugirieron una asociación significativa entre la alta expresión positiva de la oncoproteína nuclear y el aumento de la supervivencia. El análisis multifactorial empleando el modelo de riesgo proporcional de Cox también consideró la expresión nuclear de c-myc como un marcador pronóstico independiente.²²³ Los datos obtenidos de la citometría de flujo, sin embargo, sugirieron un peor pronóstico.²²² Es difícil distinguir si la amplificación de c-myc es un evento central primario en la vía molecular, o si es una respuesta al estrés de las células tumorales.^{9,222}

b.5) Bcl-2, BRCA-2, p16, NF1 y telomerasa

Aunque se han sugerido como posibles participantes en el proceso de tumorigénesis del melanoma uveal, no hay estudios definitivos que demuestren su significado pronóstico en el melanoma uveal.⁹

2.4.5.- OTROS FACTORES PRONÓSTICOS

Muchas otras características del melanoma uveal se han estudiado como valor pronóstico, pero la mayoría de ellas se consideran significativas únicamente en pocos estudios con muestras relativamente pequeñas y han ofrecido resultados contradictorios. Ejemplos de características que entran en estas categorías son: la localización del margen anterior del tumor, la pigmentación, la necrosis y el color del iris.^{140,224-226}

a) Grado de pigmentación

El grado de pigmentación es ampliamente variable en los melanomas uveales. La pigmentación puede variar considerablemente de célula a célula, de región a región, y de tumor a tumor. El pigmento melánico es mínimo o ausente en la mitad de los melanomas uveales.^{68,105,145}

El significado del grado de pigmentación fue estudiado por Callender et al.⁶⁶ y más tarde por Wilder et al.,⁶⁸ que pensaron que era un indicador pronóstico debido a que las muertes relacionadas con el tumor aumentaban con el grado de pigmentación tumoral. McLean et al.,⁸⁸ sin embargo, utilizando un análisis multivariante encontraron una ligera asociación con el pronóstico.

El COMS demostró una asociación entre el tamaño tumoral, el tipo de célula y el grado de pigmentación. Los tumores grandes y aquellos compuestos de células epitelioides mostraron con mayor frecuencia marcada pigmentación y macrófagos. Ninguno de los melanomas amelanóticos se clasificaron como epitelioides. El incremento de pigmentación se correlacionó con la necrosis. El 66,2% de los tumores

intensamente pigmentados mostraron necrosis frente al 38,7% de los mínimamente pigmentados.¹⁴⁵

b) Color del iris

Regan et al.²²⁷ determinaron en 1162 melanomas intraoculares si el iris de color claro se asociaba con un riesgo aumentado de mortalidad por melanoma. La tasa de mortalidad a los cinco y diez años relacionada con metástasis fue del 0,14 y 0,21, respectivamente, para los pacientes con iris azules o grises y 0,10 y 0,15, respectivamente, para aquellos con iris marrones. La pigmentación tumoral intensa fue más frecuente en los pacientes con iris de color marrón que azules o grises. Los resultados de este estudio sugirieron que los pacientes con iris azul o gris tienen un mayor riesgo de muerte metastásica por melanoma coroideo, independientemente de otros factores. El mecanismo por el que el color del iris puede jugar un papel en la extensión metastásica del tumor no está claro.

Otros muchos factores se han asociado con un incremento de la mortalidad: la expresión de ezrin aumentada, la baja expresión de la proteína de choque térmico-27, la expresión de metaloproteinasa-2 de la matriz, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible. Recientes estudios del melanoma uveal han identificado mutaciones en GNAQ Y GNA11. Resulta interesante el hecho de que la mutación de GNAQ, que ocurre en aproximadamente el 50% de los melanomas uveales, no se correlaciona con la supervivencia o enfermedad metastásica. Por consiguiente, se ha sugerido que la mutación de GNAQ es un evento inicial en el melanoma uveal y justifica futuras investigaciones. La mutación de GNA11 se encuentra en un 32% de los melanomas uveales y podría asociarse con un peor pronóstico en comparación con la mutación de GNAQ.^{136,187,189}

2.5.- MACRÓFAGOS

2.5.1.- GENERALIDADES

Metchnikoff,²²⁸ Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1908 por sus trabajos sobre el sistema inmunitario, identificó células capaces de digerir partículas exógenas en el tubo digestivo de las larvas de peces. A estas células las llamó “fagocitos”, y más tarde las definió como glóbulos blancos integrantes de la primera línea de defensa contra las infecciones en los seres vivos. El término “macrófago” (del griego *makros* "grande" y *phagein* "comer") fue asignado en 1924 por Aschoff a un conjunto de células componentes del sistema retículo-endotelial, que estaba formado no sólo por monocitos, macrófagos e histiocitos sino también por fibroblastos, células endoteliales y células reticulares. Posteriormente, se reemplazó este término por el de sistema mononuclear fagocítico, que incluye todas las células derivadas de los precursores monocíticos de la médula ósea (monoblasto y promonocito), los monocitos de la sangre periférica y los macrófagos o histiocitos de los distintos órganos y tejidos.²²⁹

Los fagocitos mononucleares son producto de un proceso denominado monocitopoyesis que comienza con la generación de precursores mieloides en la médula ósea, el bazo y el hígado fetal a partir de células pluripotenciales estimuladas con interleuquina-3. Los precursores mieloides comunes para el linaje granulocítico y monocítico, al ser estimulados con el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF) e interactuar con el estroma de los órganos hematopoyéticos dan lugar a los promonoblastos y generan la progenie monocito-macrófago. Los promonoblastos se diferencian a monoblastos y éstos a promonocitos que ulteriormente se convierten en monocitos, que abandonan la médula ósea, entran al torrente sanguíneo y se dirigen a los diferentes tejidos, por el influjo de quimioquinas y factores atrayentes, diferenciándose en macrófagos.

En la época en las que los histólogos sólo podían valorar la forma y las propiedades tintoriales de las células para su identificación, se consideraban dos clases de macrófagos: macrófagos libres, células móviles de forma variada que se desplazaban a través de la sustancia fundamental, y macrófagos fijos que eran elementos celulares sésiles situados entre las fibras de colágeno y con una morfología no muy diferente a la de los fibroblastos. Se suponía que ambos tipos de macrófagos tenían un origen diferente y, en alguna medida, una función también distinta. Tras la introducción de los métodos de inmunocitoquímica para la detección de moléculas específicas de superficie de las células y para conocer la histogénesis de los distintos tipos celulares mediante marcaje isotópico, se demostró que los macrófagos libres y fijos son simplemente fases diferentes del ciclo vital de células cuyo origen es el mismo.

Los términos tradicionales de macrófagos libres y fijos han sido sustituidos por otras denominaciones de carácter más descriptivo. Los macrófagos presentes normalmente, es decir, en ausencia de estímulo exógeno, en una zona concreta se llaman macrófagos residentes. Entre ellos cabe considerar: los histiocitos del tejido conjuntivo, las células de Kupffer del hígado, las células de Langerhans de la epidermis, los osteoclastos del tejido óseo, la microglía del sistema nervioso central, los macrófagos alveolares del pulmón, los histiocitos sinusales del bazo y los ganglios linfáticos y los restantes macrófagos distribuidos por la médula ósea y las serosas pleural y peritoneal. Los macrófagos que son movilizados hacia una zona en respuesta a un estímulo se denominan macrófagos provocados, y los que aumentan en gran medida sus capacidades de fagocitosis y de procesamiento de antígeno en respuesta a un estímulo local son los macrófagos activados.²³⁰

Los macrófagos derivan en su mayoría de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por el influjo de citoquinas y quimioquinas. A pesar de ello, un porcentaje de macrófagos derivan de la división local de fagocitos mononucleares en los tejidos. Generalmente esta proliferación local de macrófagos tras su emigración desde el torrente sanguíneo no es un mecanismo importante que sustente la población de fagocitos mononucleares. Numéricamente, el reclutamiento continuado de monocitos procedentes de la circulación es la fuente más importante de macrófagos.²³¹⁻²³³

2.5.2.- FUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos son una población celular heterogénea que juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, debido a que actúan como primera barrera de defensa, al detectar y eliminar partículas “extrañas” (microorganismos, macromoléculas tóxicas, células propias dañadas o muertas) mediante fagocitosis o secreción de enzimas, citoquinas o producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Durante la respuesta inmunitaria adaptativa los macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T en el contexto de las moléculas del complejo de histocompatibilidad MHC-II y/o MHC-I, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de agentes extraños. Además, los macrófagos tienen un papel importante en procesos de reparación de heridas y resolución de la inflamación, promoviendo el reclutamiento de otras células inflamatorias hacia los focos de inflamación, así como la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis. En consecuencia, el término “macrófago” agrupa una multiplicidad de células cuya finalidad es el mantenimiento de la homeostasis y la integridad tisular.²³⁴

2.5.3.- TIPOS FUNCIONALES DE MACRÓFAGOS: M1 Y M2

Los macrófagos tienen una destacada plasticidad que les permite responder eficientemente a las señales del microambiente y cambiar su fenotipo. Por ello, en presencia de determinadas interleuquinas (IL) y de productos de degradación microbiana, los fagocitos mononucleares adoptan funciones específicas.^{233,235} En similitud con la nomenclatura adoptada para la diferenciación de los linfocitos colaboradores (Th) en un fenotipo Th1, Th2 o Th17 según las IL que sintetizan, los macrófagos pueden adoptar un fenotipo funcional M1 o M2.^{233,236-239} Así, los macrófagos se polarizan en dos tipos funcionales diferentes (*Fig.27*):

1) Macrófago activado clásicamente o macrófago tipo M1:

Clásicamente, los macrófagos M1 se activan en presencia del interferón gamma (IFN- γ), aisladamente o en combinación con estímulos bacterianos (por

ejemplo, lipopolisacáridos) o con citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y GM-CSF.²³³

Los macrófagos clásicos o M1 son células presentadoras de antígenos y producen grandes cantidades de IL-12 y de IL-23, con lo cual estimulan la diferenciación de las células Th a un fenotipo Th1. Los macrófagos M1 ejercen una acción citotóxica sobre las células tumorales y son capaces de destruir bacterias intracelulares mediante la producción de intermediarios tóxicos tales como el óxido nítrico (NO), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el TNF- α .²³⁷

Los macrófagos expuestos a las señales clásicas de activación (IFN- γ y lipopolisacáridos) expresan receptores que participan en la opsonización de los microorganismos (por ejemplo, Fc γ RIII o CD16) y presentan una función inmunoestimuladora mediante la liberación de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias (como la IL-6, IL-12 y TNF- α) suscitando la respuesta inmune adaptativa. Además, este tipo de activación se asocia con la sobreexpresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II, que le confiere una mayor capacidad en la presentación de antígenos.²⁴⁰

Los macrófagos M1 presentan funciones antiangiogénicas y se consideran potentes células efectoras con capacidad para destruir microorganismos y células tumorales (fuerte actividad microbicida y tumoricida).^{245,237,241}

2) Macrófago activado alternativamente o macrófago tipo M2:

En el extremo opuesto a los macrófagos M1, se encuentran los macrófagos M2. La exposición a una variedad de señales, que incluyen IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF, inmunocomplejos y glucocorticoides u hormonas secosteroides (Vitamina D3), inducen la activación alternativa del macrófago dando lugar a los macrófagos M2, con características fenotípicas y funcionales diferentes de las de los macrófagos M1.²⁴²⁻²⁴³

Los macrófagos M2 tienen poca capacidad de presentar antígenos, secretan bajas cantidades de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6), y gran cantidad de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).^{241,243} Como resultado, tienden a suprimir la respuesta inflamatoria y las

reacciones mediadas por los linfocitos Th1 y promover respuestas Th2 ya que por ejemplo, la IL-10 expresada por los M2 puede favorecer la producción de IL-4 e IL-13 por las células Th2.^{233,244}

El macrófago activado alternativamente contribuye al proceso de cicatrización de las heridas, reparación tisular y remodelación de la matriz extracelular. También interviene activamente en la eliminación de detritus y favorecen la destrucción y encapsulación de parásitos.²³⁷ Los macrófagos M2 promueven la angiogénesis y la progresión tumoral.²³⁸ Pueden producir metaloproteinasas de la matriz (MMPs, como la MMP-9) y secretar factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), enfatizando su papel clave en la remodelación tisular y angiogénesis.²⁴⁵ Los macrófagos M2 se caracterizan por una actividad fagocítica eficiente y alta expresión de receptores de manosa y galactosa y receptores scavenger, que incluyen el CD163 y CD204.²³⁸ En resumen, los macrófagos M2 son antiinflamatorios, proangiogénicos e inmunosupresores.

Los macrófagos M1 y M2 juegan papeles opuestos durante la respuesta inmunitaria, y son considerados como macrófagos proinflamatorios y macrófagos antiinflamatorios, respectivamente.²⁴³ Esta diferenciación estricta entre macrófagos M1 y M2 no representa totalmente el continuo de estados funcionales que pueden expresar los macrófagos. Es decir, al referirnos a los macrófagos polarizados M1 y M2 éstos representan los dos extremos de un espectro o continuo de posibles formas de activación macrofágica (*Fig.28*).^{234,243,245} Sin embargo, el paradigma M1/M2 proporciona un esquema conceptual, simplificado y útil donde comenzar a descifrar las complejas funciones de los macrófagos dependientes del entorno, tanto en la enfermedad como en la remodelación tisular.²⁴⁶ Los macrófagos M1 y M2 no son necesariamente mutuamente excluyentes y con frecuencia coexisten. Así, el fenotipo mixto resultante dependerá del equilibrio entre las actividades de activación e inhibición y del ambiente tisular.²³⁹

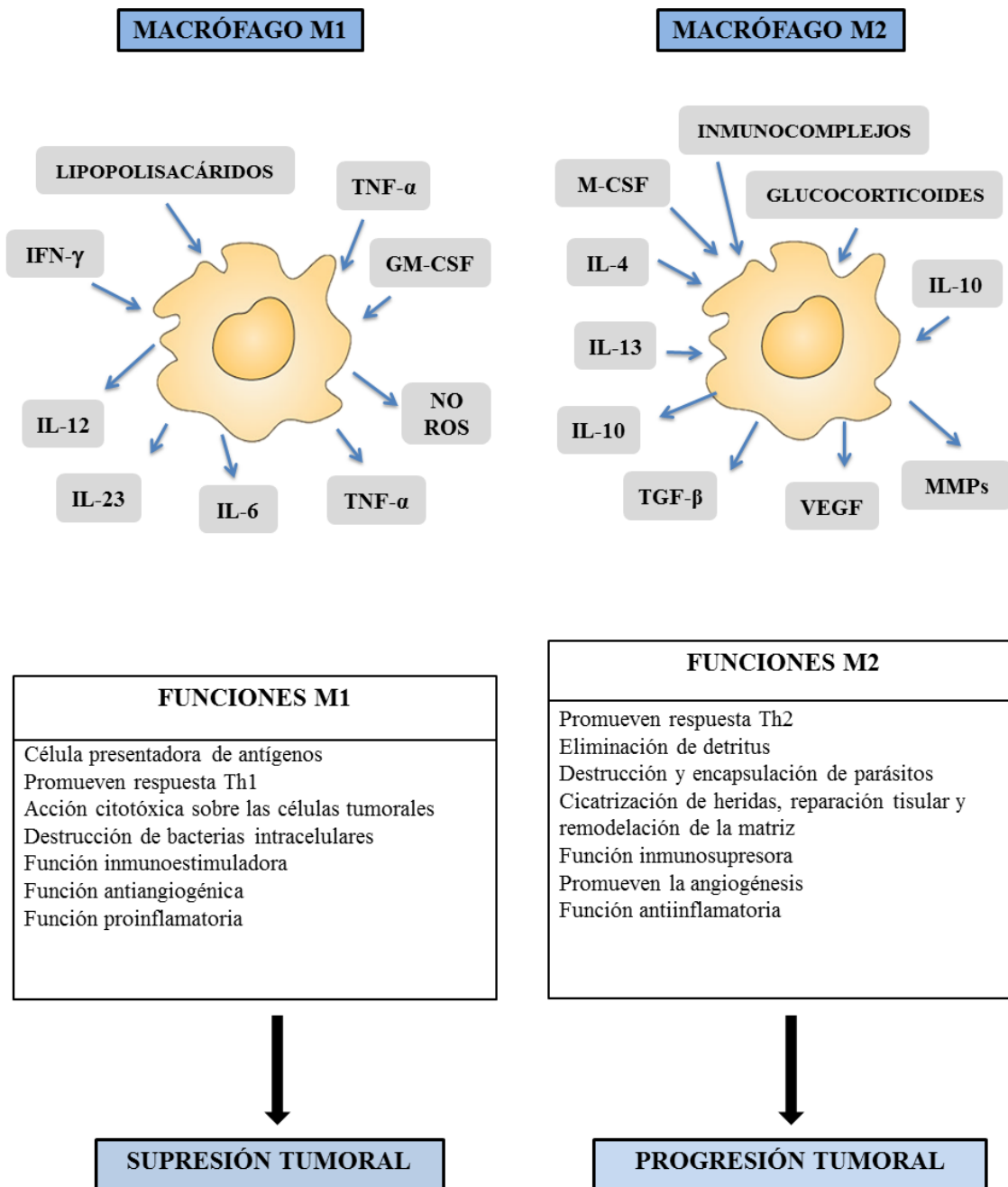


Figura 27. Tipos funcionales de macrófagos M1 y M2.

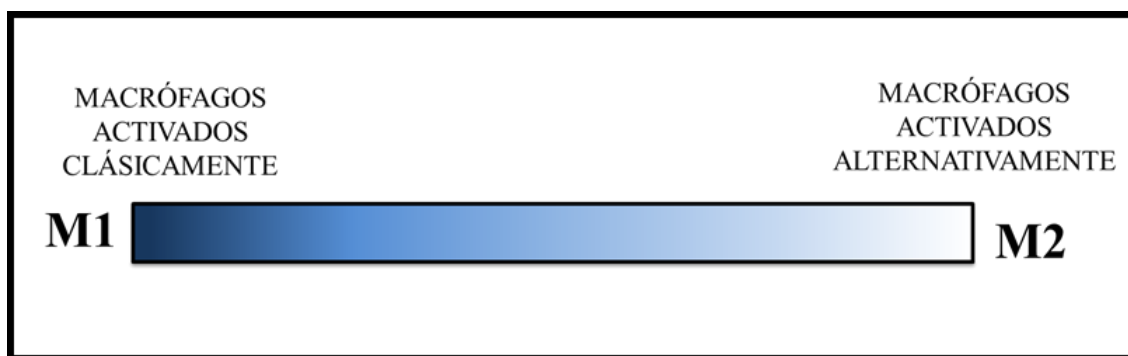


Figura 28. Espectro de posibles formas de activación de los macrófagos.

La heterogeneidad y plasticidad son características importantes de los macrófagos. Bajo distintos estímulos los macrófagos pueden polarizarse en diferentes fenotipos. Sin embargo, estos fenotipos no son estables. Varios estudios *in vivo* han demostrado que el fenotipo de una población macrofágica activada puede cambiar en el tiempo. Por ejemplo, durante la progresión tumoral el fenotipo del macrófago cambia de activado clásicamente a activado alternativamente.²⁴⁷ Por el contrario, el fenotipo del macrófago cambia de M2 a M1 en la obesidad.²³³ Sin embargo, aún no está claro si este cambio fenotípico es el resultado de una desdiferenciación del macrófago original que vuelve al estado de reposo o a la migración de una nueva población de macrófagos en el tejido que sustituyen a las células iniciales. Investigaciones *in vitro* han demostrado claramente que los macrófagos polarizados (M1 y M2) cambian su perfil de expresión en función de los estímulos.²³⁵ Por consiguiente, los macrófagos pueden repolarizarse en respuesta a los cambios en el microambiente local, permitiéndoles formar un entorno inflamatorio local para adaptarse a los estímulos externos.²³³

2.5.4.- CARACTERÍSTICAS DE LOS MACRÓFAGOS M2

Aunque el término “macrófagos activados alternativamente” fue inicialmente propuesto para identificar exclusivamente a los macrófagos activados por IL-4/IL-13,²³⁸ la variedad de estímulos que provocan una activación “no clásica” de macrófagos ha hecho necesario establecer una nomenclatura más precisa. Mantovani et al.²⁴³ han clasificado estas formas de activación alternativa de acuerdo con su estímulo inductor, proponiendo tres subpoblaciones bien reconocidas de macrófagos M2:

- ❖ Macrófagos M2a, estimulados por citoquinas IL-4 o IL-13;
- ❖ Macrófagos M2b, inducidos por la exposición a inmunocomplejos y agonistas de los receptores tipo Toll (TLRs) o IL-1R; y
- ❖ Macrófagos M2c, inducidos por IL-10 y hormonas glucocorticoides.

Aunque esta clasificación no incluye el TGF- β como activador alternativo, otros autores consideran que esta citoquina induce el fenotipo *M2c* (Fig. 29).²³³ Todos los fenotipos de M2 expresan una serie de citoquinas, quimioquinas y receptores diferentes. La polarización M2a se acompaña de producción de quimioquinas ligando 24 (CCL24), CCL17 y CCL22. Estas quimioquinas pueden específicamente combinarse con quimioquinas receptor 3 (CCR3), CCR4 y CCR8, con el consiguiente reclutamiento de eosinófilos, basófilos y células Th2 que permiten una respuesta inmune tipo II. Además se asocia con la remodelación tisular y la inmunorregulación. La polarización M2b se caracteriza por la producción selectiva de CCL1, con el consiguiente reclutamiento de células T reguladoras llevando a cabo la inmunorregulación. Por último, la polarización M2c se caracteriza por la producción de CCL16 y CCL18 y el consiguiente reclutamiento de eosinófilos y células T naive, respectivamente. Los macrófagos M2c están más relacionados con la supresión de la respuesta inmune y estimulan la remodelación tisular.^{233,243}

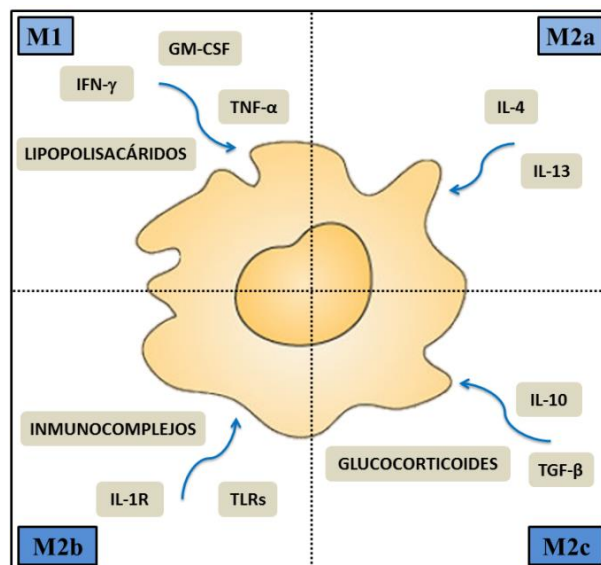


Figura 29. Polarización del macrófago en función del estímulo de activación.

2.5.4.- MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Los tumores sólidos están constituidos no sólo por las células tumorales sino también por una cantidad variable de células no tumorales, que generan un microambiente único que puede modificar las propiedades de las células neoplásicas.^{236,237}

El microambiente tumoral contiene células inmunes innatas (macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras derivadas de la línea mieloide, células dendríticas, y células natural killer) y células inmunes adaptativas (linfocitos B y T) además de las células tumorales y el estroma circundante (que consta de los fibroblastos y las células endoteliales de los vasos sanguíneos/linfáticos, entre otros).^{236,237,248} Las células inmunes encontradas con mayor frecuencia en este microambiente tumoral son los macrófagos seguido de las células T.^{248,249} Las diferentes células que componen este microambiente se comunican entre sí mediante contacto directo o la producción de citoquinas o quimioquinas, actuando de manera autocrina o paracrina para controlar y determinar el crecimiento tumoral.²⁴⁸ En este microambiente tumoral están presentes, además de los componentes celulares anteriormente descritos, una amplia variedad de moléculas biológicamente activas, en forma soluble o asociadas a proteínas de la matriz extracelular. Estas incluyen, por ejemplo, factores de crecimiento, factores quimiotácticos para el reclutamiento de células inmunes en la masa tumoral, y una gran cantidad de enzimas proteolíticas que remodelan activamente la matriz circundante.^{237,250} Así, el microambiente tumoral es el lugar donde diferentes componentes celulares expresan un rico y complejo perfil de moléculas tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas, capaces de repercutir en el sistema inmune y afectar al tropismo del tumor.²⁵¹

a) Papel de los macrófagos asociados a tumor en la progresión tumoral

La primera descripción de la existencia de leucocitos en tumores humanos fue realizada por Rudolf Virchow en 1862, quien propuso que el cáncer surgía en regiones de inflamación crónica, proporcionando la primera evidencia de la posible relación entre cáncer e inflamación.²³⁶ Actualmente se ha establecido que los macrófagos constituyen

el principal componente de la población inmune presente en los tumores.^{233,235-237,252} Los macrófagos que infiltran el microambiente tumoral son denominados macrófagos asociados a tumor (TAMs)²³¹ y aunque la mayoría derivan de los monocitos sanguíneos reclutados desde la circulación en la masa tumoral, hay evidencia de una proliferación local de macrófagos.²⁵³ Los TAMs han sido estudiados ampliamente por su relación con las células tumorales y sus múltiples funciones en el microambiente tumoral.^{236,237} Los TAMs modulan varios aspectos del cáncer, tales como la progresión tumoral, la angiogénesis, el crecimiento tumoral, la inmunosupresión y el depósito y la remodelación de la matriz (*Fig.30*).²³³

a.1) Reclutamiento de monocitos

Las células tumorales y estromales producen una serie de quimioquinas y factores de crecimiento capaces de reclutar monocitos circulantes e inducir su diferenciación a macrófagos.^{233,254} Por ejemplo, la quimioquina CCL2, principal quimioquina derivada de los tumores, es crucial para el reclutamiento de los macrófagos intratumorales.²³³ Esta quimioquina también es producida por los fibroblastos, las células endoteliales y los TAMs, con lo cual se establece una retroalimentación positiva.^{233,237,250,253} Altos niveles de CCL2 se correlacionan con un número aumentado de TAMs.^{231,255}

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) son otras de las moléculas que atraen monocitos/macrófagos al tejido tumoral. Estos factores, además, estimulan la diferenciación de los monocitos en macrófagos e intervienen en la supervivencia de estos últimos (principalmente el M-CSF).²³⁷ Se ha demostrado que la reducción de M-CSF disminuye notablemente la infiltración de macrófagos en el tumor, y esto se correlaciona con un retraso significativo de la progresión tumoral. Por el contrario, la sobreexpresión de M-CSF por las células tumorales incrementa considerablemente el reclutamiento de macrófagos, y ello se correlaciona con el crecimiento tumoral acelerado.²³⁶

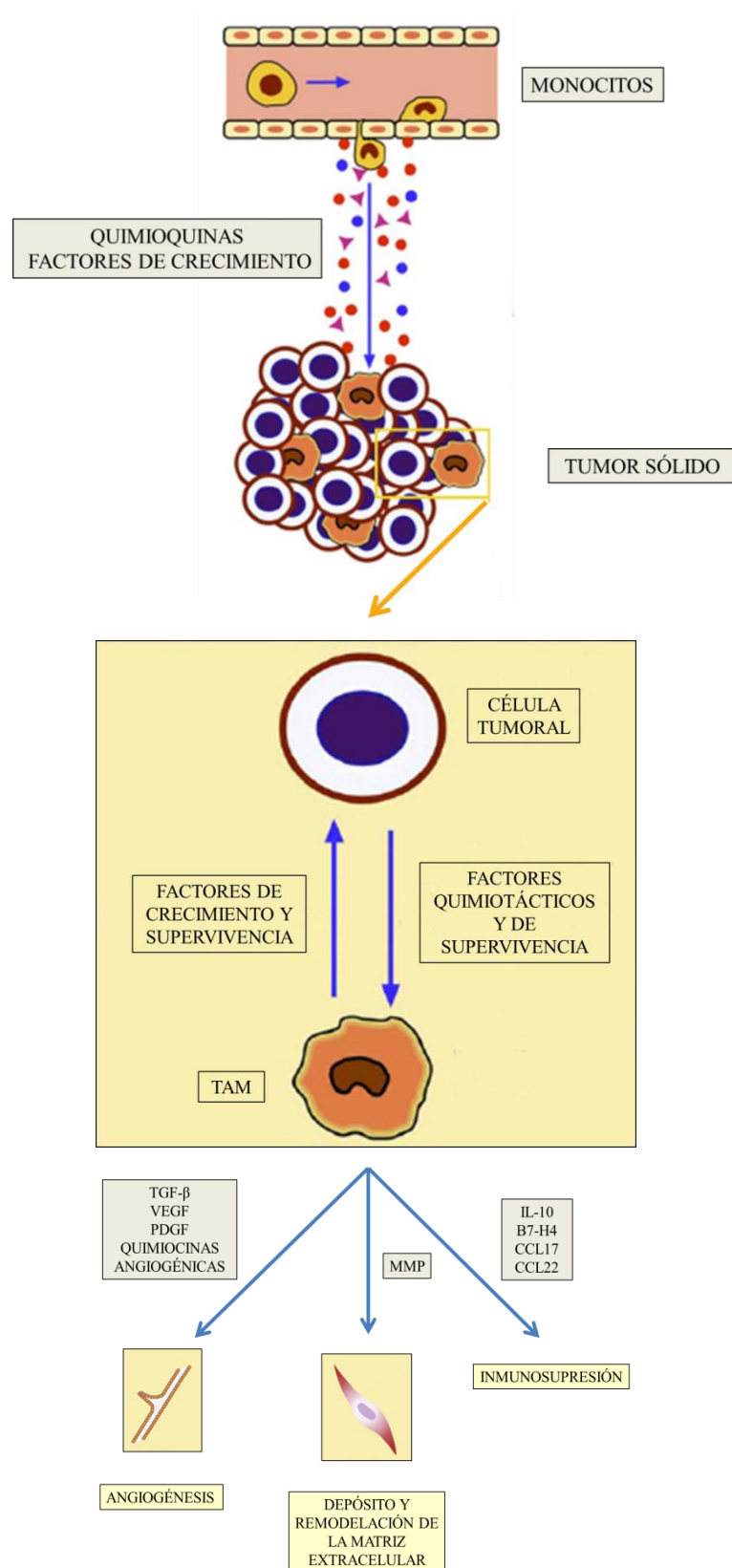


Figura 30. Papel de los macrófagos asociados a tumor en la progresión tumoral.

Mientras el tamaño tumoral es pequeño, los macrófagos de los tejidos circundantes se acumulan dentro y alrededor del tumor atraídos por las moléculas quimiotácticas derivadas de las células tumorales descritas anteriormente, y la mayoría de los TAMs derivan de estos macrófagos de los tejidos circundantes. Cuando el tumor aumenta de tamaño y forma una red vascular intratumoral, los monocitos pasan a ser la fuente principal de TAMs.²⁵⁶

a.2) Macrófagos asociados a tumor y angiogénesis

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Es un requerimiento para cualquier tumor que crezca más de 2-3 mm³ ya que garantiza el adecuado aporte de nutrientes y oxígeno, necesarios para el crecimiento de las células tumorales, ofreciendo además una manera efectiva de eliminación de los productos de desecho. Asimismo, la angiogénesis proporciona una vía de salida para las células tumorales al torrente sanguíneo, un paso fundamental para la formación de metástasis.^{233,251}

El proceso de la angiogénesis involucra a varios tipos celulares y mediadores, que interactúan para establecer un microambiente específico adecuado para la formación de nuevos vasos. Existen factores proangiogénicos y antiangiogénicos secretados por las células tumorales, estromales e inflamatorias que contribuyen a la regulación de la angiogénesis.^{251,257}

Los macrófagos pueden ejercer una doble influencia en la formación de vasos sanguíneos: por un lado, producen moléculas que son proangiogénicas, y por otro lado pueden expresar moléculas antiangiogénicas que dañan la integridad de los vasos sanguíneos.²⁵⁸ Además, los macrófagos tienen la capacidad de inhibir la angiogénesis mediante la producción de una proteína antiangiogénica llamada inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2), cuya expresión se asocia con un pronóstico favorable.²⁵¹ Los TAMs también pueden inhibir la angiogénesis mediante la producción de trombospondina 1 (TSP1). TSP1 es una proteína de la matriz extracelular producida por los macrófagos, que inhibe la migración y proliferación de las células endoteliales in vitro y la neovascularización in vivo, mediante la inducción de inhibidores del activador

del plasminógeno. Por lo tanto, los TAMs pueden tener tanto efecto positivo como negativo en la angiogénesis. Aunque en general, en cuanto a la interacción con las células neoplásicas prevalecen sus funciones proangiogénicas.^{258,261}

La angiogénesis, un proceso esencial para el crecimiento y progresión tumoral, es una función asociada a los macrófagos M2.²³⁷ Los TAMs promueven la angiogénesis mediante la producción de diversos factores pro-angiogénicos entre ellos, TGF- β , VEGF, PDGF, miembros de la familia FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y quimioquinas angiogénicas.^{231,237} Se ha observado que en el cáncer de mama y en otros tumores humanos, la densidad de la microvasculatura o de microvasos se correlaciona con la magnitud de la infiltración con macrófagos.²³⁷ En el cáncer de pulmón, los TAMs pueden favorecer la progresión tumoral contribuyendo a la formación del estroma y a la angiogénesis mediante la liberación de PDGF junto con la producción del TGF-beta por las células neoplásicas.²³¹ Los TAMs también ejercen una actividad procoagulante mediante el depósito de fibrina, con lo cual indirectamente se incrementa la formación de vasos sanguíneos.²³⁶

Ciertas quimioquinas producidas por los TAMs tienen un papel fundamental en la angiogénesis. El extremo terminal de algunas quimioquinas CXC tiene una secuencia conservada de aminoácidos conocida como ELR *motif*. En general, las quimioquinas ELR+ son fuertes inductores de la angiogénesis, mientras que las quimioquinas sin la secuencia ELR se caracterizan por la capacidad para bloquear o inhibir dicho proceso. Las primeras incluyen la CXCL1 hasta la CXCL8, con excepción de la CXCL4; todas ellas actúan sobre un receptor común, el CXCR2, un hallazgo que permite intervenciones terapéuticas específicas. Por otra parte, los TAMs participan en el proceso proangiogénico mediante la producción del factor angiogénico timidina fosforilasa que estimula la migración de las células endoteliales in vitro y cuyos niveles de expresión se asocian con la neovascularización tumoral.²⁴⁷ También se ha demostrado que los TAMs expresan CXCL8, que como el VEGF, se une a la heparina en la matriz extracelular y estimulan la angiogénesis. Por lo tanto, los TAMs tienen la capacidad de afectar a cada fase del proceso de la angiogénesis, incluyendo la degradación de la matriz extracelular, la proliferación de las células endoteliales y la migración de dichas células.²⁵⁵ Existe una creciente evidencia que

indica que los macrófagos pueden promover el proceso de linfangiogénesis junto con la angiogénesis tumoral.²⁶⁰

Los tejidos neoplásicos se caracterizan por la vascularización irregular y la hipoxia; estas características se han asociado con mayor riesgo de progresión tumoral, invasión local, metástasis a distancia y poca respuesta terapéutica. Los TAMs se acumulan preferentemente en las regiones tumorales con escasa vascularización que se caracterizan por una baja presión de oxígeno.²³³ La hipoxia desencadena estímulos proangiogénicos tanto en las células neoplásicas como en los TAMs. El factor de transcripción inducible por la hipoxia 1 (HIF-1) regula la adaptación de las células a la baja concentración de oxígeno y, por lo tanto, representa otro posible blanco terapéutico. El HIF-1 interviene en el paso del metabolismo aeróbico al anaeróbico, confiriendo a las células tumorales un fenotipo glicolítico que les garantice sus requerimientos energéticos. Con ello, dichas células neoplásicas pueden sobrevivir en condiciones adversas.²³⁷

En el microambiente tumoral, el estadio del crecimiento tumoral determina la función de los TAMs. En estadios precoces del crecimiento tumoral, la presencia de los TAMs retrasará la proliferación de las células tumorales. Pero cuando el tumor crece más allá de los 2-3 mm³, los TAMs contribuyen significativamente a la progresión tumoral mediante la secreción de los factores angiogénicos. Además, como los macrófagos son fagocitos pueden ser atraídos a las áreas perinecróticas, hipóxicas a lo largo de un camino de restos necróticos que surgen de dichas áreas. Asimismo, la hipoxia parece que inhibe la migración de los macrófagos, inmovilizándolos en tales áreas.²⁶¹

a.3) Macrófagos asociados a tumor y remodelación de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) representa una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta a las células que se encuentran en los tejidos. Está formada por un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos dispuestos en el espacio intersticial. Constituye un filtro de protección, nutrición e innervación celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular.²⁶²

La invasión tumoral depende en gran medida de la acción permisiva del microambiente. Un factor crítico es la producción de enzimas proteolíticas implicadas en la degradación y remodelación de la MEC.²⁶³

Desde hace tiempo se conoce que las proteasas derivadas de los tumores pueden descomponer las proteínas de la MEC dando paso a la disolución de la membrana basal, facilitando así el proceso de invasión de la célula tumoral. En el estroma tumoral, los macrófagos son una fuente importante de enzimas proteolíticas, tales como la plasmina, el activador del plasminogeno tipo uroquinasa, la catepsina B y las metaloproteasas de la matriz (MMP) que actúan directamente en la remodelación de la MEC, regulando la digestión de dicha matriz.^{237,254,255} La actividad de estas enzimas se ha asociado a un comportamiento neoplásico más agresivo ya que facilitan el escape de las células tumorales desde la masa tumoral, la invasión tumoral y el desarrollo posterior de metástasis a distancia.²³⁷

Entre estas enzimas, las MMP representan una familia de enzimas que degradan la matriz y que se han implicado en la progresión tumoral debido a su capacidad para degradar la membrana basal, activar factores de crecimiento y potenciar la angiogénesis.^{254,260,263} Se ha demostrado que los TAMs, preferentemente los macrófagos M2, son una fuente importante de MMP-9.²⁵⁵

a.4) Papel de los macrófagos asociados a tumor en la inmunosupresión

Una característica de los macrófagos M2 es la capacidad para suprimir la respuesta inmune adaptativa mediante mecanismos que incluyen la reducción de la actividad de presentación de antígenos y la inhibición de la proliferación de las células T. Los TAMs modulan la respuesta inmune al tumor a través de la expresión aumentada de enzimas, quimioquinas y citoquinas que modulan la acción de las células presentadoras de antígeno y la función de las células T y B.^{237,259}

Los TAMs producen y liberan varias citoquinas inmunosupresoras, de las cuales, la IL-10 ha sido ampliamente estudiada. Además producen bajos niveles de citoquinas inmunoestimuladoras tales como TNF- α , IL-1 e IL-12, al menos en los tumores avanzados. La IL-10 sólo o en combinación con la IL-6 es responsable de la mayor

expresión del antígeno B7-H4 en los macrófagos, una molécula que inhibe la funcionalidad de las células T contra antígenos tumorales específicos.²⁴⁷

Parte de la actividad inmunosupresora de los TAMs se ejerce indirectamente mediante la liberación de citoquinas que preferentemente atraen células T desprovistas de funciones citotóxicas. Por ejemplo, las citoquinas CCL17 y CCL22 son producidas abundantemente por los TAMs. Estas quimioquinas interactúan con el receptor CCR4, que se expresa sobre todo, en las células Th2 y las células T reguladoras, que carecen de función antitumoral.²³⁷

En líneas generales, podemos decir que los TAMs generan factores que impiden la infiltración de células con actividad antitumoral (por ejemplo, células citotóxicas) y aumentan el reclutamiento de células que inhiben la respuesta inmune (por ejemplo, células T reguladoras).²⁶⁰

a.5) Interacción entre macrófagos asociados a tumor y células madre neoplásicas

En los últimos 5-10 años, se ha observado la existencia de una subpoblación específica de células tumorales con características distintivas de célula madre en los tumores. Estas células se definen como células iniciadoras del cáncer o células madre del cáncer (CSCs). Una CSC tiene la capacidad de iniciar la tumorigénesis mediante la autorrenovación y diferenciación. Sin embargo, también se conoce que las células estromales, tales como los fibroblastos y las células inmunes, juegan un papel importante en la progresión tumoral.²⁶⁴ Por lo tanto, la investigación sobre la relación entre las CSCs y las células estromales se ha convertido en una emocionante área de interés.

Los TAMs, como componentes de las células inmunes predominantes, están espacialmente relacionados con las CSCs. Varios estudios han publicado que los TAMs siempre se hallan distribuidos alrededor de las CSCs, y que el número de TAMs infiltrantes se ha correlacionado positivamente con el grado histológico de malignidad y el número de CSCs observadas.²³³

Aunque la investigación sobre la interacción entre los macrófagos y las CSCs se encuentra todavía en una fase inicial, los estudios indican que los macrófagos promueven la proliferación de las CSCs y las metástasis.^{233,264}

2.5.5.- MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR COMO FACTOR PRONÓSTICO

Numerosos estudios se han centrado en identificar el valor pronóstico de los TAMs en una amplia variedad de tumores sólidos.²⁶⁵ La mayoría de estos estudios sugieren que los TAMs favorecen el crecimiento tumoral y, por consiguiente, se asocian con un peor pronóstico. En un amplio espectro de carcinomas tales como los de mama, cérvix, vejiga, ovario, páncreas, endometrio, esófago, linfoma folicular y melanoma uveal, se ha demostrado que la presencia de un extenso infiltrado de TAMs se correlaciona con un peor pronóstico.^{233,253,265,293} En cambio, en otros tumores, como los de próstata, pulmón y cerebro hay estudios contradictorios respecto al papel de los TAMs en la supervivencia de estos pacientes.²⁶⁵

Esta aparente contradicción entre estudios de un mismo tipo de tumor puede reflejar diferencias en el número, grado, estadio y tamaño de los tumores incluidos en cada estudio. Además, en estos estudios se han utilizado una amplia variedad de métodos para evaluar el infiltrado de los TAMs.

Zhang et al.²⁶⁵ llevaron a cabo un reciente metaanálisis teniendo en cuenta los datos aportados de 55 estudios donde se evaluaron la correlación entre TAMs y supervivencia de pacientes con tumores sólidos. Estos autores concluyeron que la presencia de macrófagos se asociaba con una supervivencia disminuida en el carcinoma de endometrio, vejiga urinaria, mama, ovario, estómago y cavidad oral. Por el contrario, un incremento en la densidad de TAMs aumentaba la supervivencia global en pacientes con carcinoma colorrectal.

Aunque el valor pronóstico de los TAMs en la supervivencia de pacientes con tumores sólidos sigue siendo controvertido,²⁶⁵ en general, teniendo en cuenta todos los estudios (independientemente del número de muestras y métodos empleados) más del 80% muestran una asociación significativa entre una mayor densidad de TAMs y un

peor pronóstico, mientras que menos del 10% asocian el incremento de TAMs con un buen pronóstico.²⁴⁹ Por lo tanto, una densidad de TAMs incrementada, generalmente, se asocia con una progresión tumoral avanzada y con metástasis.²⁶⁷

2.5.6.- MARCADORES DE LOS MACRÓFAGOS M1 Y M2.

Como hemos comentado existe un creciente interés en estudiar la importancia pronóstica del infiltrado de macrófagos en los tumores sólidos.

El anticuerpo anti-CD68 reconoce una glicoproteína citoplasmática de unos 110 kD relacionada con los lisosomas, que parece tener un papel en la actividad fagocítica de los macrófagos.²⁶⁸ Los marcadores para el antígeno CD68 son los usados con mayor frecuencia para la identificación de los macrófagos en inmunohistoquímica. La mayoría de los estudios consideran al CD68 como un marcador genérico (Pan-macrófagos) de todos los subtipos de macrófagos.^{241,256,269-271} Sin embargo, a pesar de ser ampliamente utilizado como marcador de la línea monocito/macrofágica se ha descrito expresión de anti-CD68 en otros tipos de células como, fibroblastos y células endoteliales.^{270,272,273}

El antígeno CD163 es una glicoproteína de 130kd que, recientemente, se ha caracterizado como un receptor *scavenger* para la hemoglobina que limpia los complejos haptoglobina-hemoglobina de la circulación.^{274,275} El CD163 es un marcador altamente específico de células de la línea monocito-macrofágica.^{270,275,276} Existe evidencia que indica que los TAMs de fenotipo M2 expresan altamente CD163, por lo que este marcador se considera útil para distinguir los TAMs con un fenotipo M2 de los que poseen un fenotipo M1.^{256,269,277-279}

2.6.- EL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO EN EL MELANOMA UVEAL

El microambiente juega un papel importante durante las diferentes etapas del desarrollo de la mayoría de los tumores malignos y en su progresión. Es importante tener en cuenta las distintas células presentes en el microambiente tumoral ya que la interacción entre estas células puede afectar tanto el crecimiento tumoral como la

función de los macrófagos. Con respecto al melanoma uveal, este infiltrado consta de un grupo heterogéneo de células.²⁸⁰ La tipificación de estas células inmunes se basa en marcadores de superficie celular y por consiguiente, ponen de manifiesto las características fenotípicas más que las funcionales.²⁸¹

2.6.1.- LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILS) EN EL MELANOMA UVEAL

En aproximadamente el 5-12% de los melanomas uveales, es posible identificar infiltración del tumor por linfocitos.²⁷⁶ La mayoría son células T y su presencia refleja probablemente el grado de expresión antigénica tumoral.^{283,284}

Los TILs son linfocitos localizados en los infiltrados inflamatorios presentes en los islotes tumorales y en el estroma peritumoral de los tumores sólidos.²⁸⁵ Se piensa que representan un importante componente de la respuesta inmune del huésped al tumor.¹³⁹ La evaluación del significado pronóstico de los TILs en otros tumores malignos puso de manifiesto que el aumento del número de TILs se asociaba a menudo con un mejor pronóstico.²⁸⁶

Varias publicaciones han estudiado la densidad y la composición de los linfocitos intratumorales en el melanoma uveal.^{140,281-283} Estos estudios son contradictorios en lo que se refiere a su importancia pronóstica, reflejo de la metodología subjetiva y de la variabilidad del tamaño muestral empleados.

Durie et al.²⁸³ analizaron los TILs, en un estudio con 27 melanomas uveales, mediante citometría de flujo y los resultados demostraron un predominio de linfocitos T supresores/citotóxicos. El número de TILs se relaciona probablemente con el nivel de expresión de HLA en el melanoma uveal.¹⁸⁶

El mayor estudio hasta la fecha llevado a cabo por de la Cruz et al.,¹⁴¹ relacionó el número de TILs con la supervivencia de los pacientes en 1078 casos de melanomas uveales del AFIP. 134 tumores (12,4%) contenían 100 o más TILs/ 20 CGA (400x) y se identificaron como “con un elevado número de linfocitos”. Un porcentaje similar de casos tenía menos de 100 TILs/20 CGA (400x) y constituyeron el grupo “con un bajo

número de linfocitos”. La tasa de supervivencia a los 15 años en el primer grupo fue del 36,7%, en comparación con el 69,6% en el segundo grupo. Utilizando el modelo de Cox los autores concluyeron que el aumento del número de linfocitos por 20 CGA se asociaba significativamente con el descenso de la supervivencia incluso cuando eran valorados otros factores. A este estudio se le han puesto varias objeciones, entre ellas el establecer un punto de corte bastante arbitrario de 100 linfocitos.⁹

Whelchel et al.²⁸⁴ caracterizaron el perfil inmunohistoquímico de los TILs mediante marcadores para células B y T, en 80 casos de melanomas uveales previamente estudiados por de la Cruz et al.¹⁴¹ y que contenían más de 100 TILs /20CGA (43x). En este estudio, diseñado prospectivamente, las células T predominaban en el 73,8% de los 80 pacientes mientras que las células B eran el tipo predominante en el 13,8%. Estos autores observaron dos patrones de tinción diferentes: las células T generalmente se veían como células únicas dispersas por todo el tumor y ocasionalmente en grupos pequeños, mientras que las células B se disponían predominantemente en grupos, y con frecuencia asociadas a un infiltrado plasmacítico. La asociación entre los TILs en el melanoma uveal y la supervivencia del paciente se analizó en un segundo estudio retrospectivo. Contaron el número de linfocitos T teñidos inmunohistoquímicamente por 20 CGA en tres grupos de 30 casos cada uno, basados en la evolución del paciente: 30 pacientes libres de metástasis al menos 15 años después de la enucleación, 30 pacientes que fallecieron con metástasis de melanoma en los dos años tras la enucleación, y 30 pacientes que fallecieron con metástasis más de 10 años después de la enucleación. Los melanomas uveales de pacientes que sobrevivieron contenían menos linfocitos T/20 CGA que los de los pacientes que fallecieron por enfermedad metastásica. La diferencia en el número de linfocitos T entre los pacientes que fallecieron en los dos años tras la enucleación y aquellos que fallecieron más de 10 años tras la enucleación no fue estadísticamente significativa. Estos autores concluyeron que existía un claro predominio de células T en la mayoría de los tumores y que la infiltración por linfocitos T se asociaba con la muerte debida a metástasis de melanoma uveal.

En una reciente publicación se relaciona la presencia de TILs con la pérdida del cromosoma 3. También se evalúa el papel de un tipo específico de célula inmune

denominada célula T reguladora (Treg). Estas células Treg son una subpoblación especializada de células T CD4⁺ requeridas para el mantenimiento de la autotolerancia y que suprimen la activación del sistema inmune.²⁸⁷ Las Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción nuclear Foxp3.²⁸⁸ El número incrementado de estos linfocitos inmunosupresores se ha detectado en una variedad de tumores malignos y parece que se asocia con peor pronóstico. En el melanoma uveal, se ha observado que las células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) están presentes en el 12-24% de los melanomas uveales.^{288,289} Las células natural killer (NK) son escasas en el melanoma uveal¹⁸⁰ y las células B, raras.^{186,283}

2.6.2.- MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR (TAMS) EN EL MELANOMA UVEAL

En el melanoma uveal, se ha relacionado la densidad aumentada de macrófagos CD68-positivos con un pronóstico desfavorable.^{290,291} Mäkitie et al.²⁹⁰ estudiaron la presencia de macrófagos en 167 casos de melanomas uveales y observaron que el número de macrófagos se asociaba con tres indicadores pronósticos conocidos tales como la presencia de células epitelioides, el aumento de la densidad microvascular y el diámetro tumoral. Además, estos autores demostraron una fuerte asociación entre el aumento de la mortalidad específica por melanoma y el número aumentado de macrófagos CD68-positivos.

En humanos, los macrófagos M2 se caracterizan por una alta expresión de CD163 y la mayoría de los macrófagos en el melanoma uveal presentan esta característica, es decir, el principal tipo de macrófago presente en el melanoma uveal es del tipo M2.²⁹²⁻²⁹⁵

La conjunción de TAMs, TILs y la expresión aumentada de moléculas relacionadas con la inflamación (HLA de clase I y II) se conoce como fenotipo inflamatorio del melanoma uveal. El fenotipo inflamatorio se correlaciona con una alteración genética específica, es decir, la pérdida de una copia del cromosoma 3.¹⁶⁴ Bronkhorst et al.²⁸⁷ demostraron una clara asociación entre la monosomía 3, un indicador altamente fiable de mal pronóstico en el melanoma uveal, y la presencia de un

complejo infiltrado inmune, que incluye a linfocitos CD8 y CD4, Treg Foxp3+ y los macrófagos M2 proangiogénicos e inmunosupresores.

Los mecanismos genéticos exactos implicados en la patogénesis del melanoma uveal siguen siendo desconocidos, pero estos eventos pueden incluir la activación de varios tipos de oncogenes por mutación, o la inactivación de genes supresores de tumores, iniciando un mecanismo patofisiológico en los que la inflamación y los TAMs juegan un papel importante.^{166,287}

En el melanoma uveal, se postulan varios mecanismos a través de los cuales el tumor puede beneficiarse del microambiente inflamatorio. En lugar de una fuerte respuesta antitumoral, las células inmunes en el microambiente, y en particular los macrófagos, probablemente adoptan un papel trófico durante la progresión tumoral. El melanoma uveal puede reclutar activamente macrófagos, con los que crean sinergias para establecer un ambiente proangiogénico, inmunosupresor, y por tanto, prometastásico, que reducen las respuestas inmunes innatas y adaptativas.²⁸¹

Por otro lado, los macrófagos que presentan moléculas menos immunoestimuladoras pueden inducir Tregs, suprimiendo así la inmunidad tumoral. Los Tregs pueden además estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos M2 promotores de tumores.²⁸⁷

Un determinante muy importante en el melanoma uveal es la angiogénesis. Recordemos que las células del melanoma uveal se diseminan hematógicamente ya que no existen linfáticos en el ojo. Una alta densidad microvascular se asocia con el número de TAMs,²⁹⁰ que puede atribuirse a su fenotipo M2 proangiogénico.²⁸⁶ El importante papel proangiogénico que pueden jugar los macrófagos en los tumores oculares se ha demostrado en un estudio animal donde la eliminación de los macrófagos predominantemente M2 en ratones viejos mediante la inyección sistémica de liposomas que contienen clodronato reducían directamente el crecimiento tumoral.²⁹⁶

Los TAMs pueden dar lugar a un ambiente inmunosupresor ya que los macrófagos M2 producen citoquinas antiinflamatorias tales como la IL-10 y el TGF- β . El microambiente del melanoma uveal incluye componentes solubles, por ejemplo

citoquinas que pueden derivar tanto de las células neoplásicas como de las no neoplásicas. La inflamación no sólo se localiza en el tumor en sí, ya que los ojos con melanoma uveal con frecuencia presentan niveles aumentados de citoquinas relacionadas con la inflamación en su humor acuoso. Además, este estudio demostró que la presencia de estas citoquinas inflamatorias era independiente de la población de macrófagos presentes en el tumor.²⁹⁷

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El melanoma uveal constituye el tumor maligno primario intraocular más frecuente en el adulto y la segunda localización de melanoma maligno en frecuencia, comprendiendo el 5,3% de todos los casos de melanoma. Su incidencia anual estimada varía según los países entre 4 y 10 casos por millón de habitantes, y si bien es una neoplasia relativamente infrecuente, la aparición de metástasis en el curso de la evolución clínica es y aún hoy la principal causa de muerte en estos pacientes. Aproximadamente el 50% de los pacientes desarrolla enfermedad metastásica.

A pesar de la mejora obtenida respecto a la preservación del globo ocular y la función visual con los nuevos tratamientos, en los estudios publicados sobre supervivencia en pacientes con melanomas uveales se observa que ésta es independiente del tratamiento local utilizado y que no ha variado en los últimos 50 años. Las tasas de supervivencia relativas se estiman en un 77-84% a los cinco años. Mientras que la supervivencia media de los pacientes con enfermedad metastásica es de 4-5 meses con una supervivencia al año del 10-15%.

Por todo ello, la identificación de factores predictivos del comportamiento biológico y de la capacidad de los melanomas uveales para dar metástasis es un ámbito de gran interés clínico y sanitario. En este sentido, se han propuesto factores pronósticos de muy diversa índole, tanto clínicos como histopatológicos, inmunohistoquímicos y genéticos, pero aún no se ha alcanzado un suficiente grado de consenso sobre el valor de cada uno de ellos. Más aún, los propios criterios diagnósticos para la caracterización histopatológica de los subtipos de melanoma uveal y consecuentemente la clasificación anatomopatológica de esta neoplasia es todavía motivo de controversia.

El Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla es desde hace años un centro de referencia en Andalucía para el diagnóstico y tratamiento de los melanomas uveales. Ello nos ha permitido reunir una serie muy amplia de casos, mayor que la mayoría de las publicadas, y disponer de todos datos clínicos y del seguimiento de los pacientes tratados. Además se ha contado con todas las piezas quirúrgicas de enucleación que, incluidas en parafina, estaban archivadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital para llevar a cabo el amplio estudio histopatológico, inmunohistoquímico y genético que presentamos.

Con el estudio clínico-patológico de todos los casos, así como el análisis inmunohistoquímico del microambiente tumoral, particularmente de las subpoblaciones macrofágicas y linfocitarias que acompañan a las células neoplásicas, y la indagación de la monosomía 3 en estas últimas se han perseguido los siguientes objetivos:

- ❖ Caracterizar los distintos tipos clínico-patológicos de melanoma uveal, partiendo de la identificación de unos tipos histopatológicos y su relación con el curso clínico, el fenotipo inflamatorio del tumor y las alteraciones genéticas, entre otros.
- ❖ Estudiar los rasgos histopatológicos, inmunohistoquímicos y genéticos que condicionan el pronóstico del melanoma del tracto uveal y contribuir a definir grupos pronósticos de pacientes que podrían beneficiarse de diferentes períodos de seguimiento y protocolos de tratamientos adyuvantes más personalizados.
- ❖ Impulsar el estudio sistematizado y completo de los melanomas uveales y para ello proponer un protocolo de estudio anatomopatológico que incluya el estudio genético de la neoplasia y un perfil inmunohistoquímico del microambiente tumoral.
- ❖ Resolver algunas dificultades técnicas que conlleva el estudio inmunohistoquímico de neoplasias en general muy pigmentadas, así como proponer un procedimiento estandarizado de blanqueamiento tisular que no altere sus características histológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En el presente trabajo se han estudiado retrospectivamente 79 melanomas primarios uveales diagnosticados histológicamente a partir de piezas de enucleación o exenteración, entre el 21 de Noviembre de 2000 y el 16 de Enero de 2012, en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla (centro de referencia en Andalucía para el tratamiento de los tumores intraoculares del adulto). Fueron excluidos todos aquellos casos de melanomas primarios de otras estructuras oculares o anejos (conjuntiva, párpados...).

MÉTODOS

1.- DATOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes del estudio, tanto en soporte papel (a partir del Archivo de Historias Clínicas del Hospital Universitario Virgen Macarena) como en soporte informático (a través de la Historia de Salud Única Digital del Sistema Sanitario Público de Andalucía, DIRAYA), para obtener los siguientes datos:

1.1.- SEXO

Se anotó el sexo (hombre/mujer) de cada uno de los pacientes en función de los datos de filiación reseñados en la historia clínica.

1.2.- EDAD

De cada paciente se recogió la edad (en años) en el momento del diagnóstico anatomopatológico. Para el tratamiento estadístico se hicieron los siguientes grupos etarios: pacientes < de 50 años, de 50 a 70 años y > de 70 años.

1.3.- LATERALIDAD

Se registró en cada caso la lateralidad del ojo afecto (ojo derecho u ojo izquierdo).

1.4.- LOCALIZACIÓN DEL TUMOR

Los melanomas fueron clasificados según la localización dentro del tracto uveal: iris, cuerpo ciliar y coroides. En aquellos casos en los que el tumor comprometía a varias partes o componentes del tracto uveal (iris-cuerpo ciliar, cuerpo ciliar-coroides o iris-cuerpo ciliar-coroides, es decir, en casos de melanoma iridociliar, ciliocoroideo o iridociliocoroideo) se consideró como localización inicial aquella que contenía más de las 2/3 partes de la masa tumoral (*Fig. 31*).

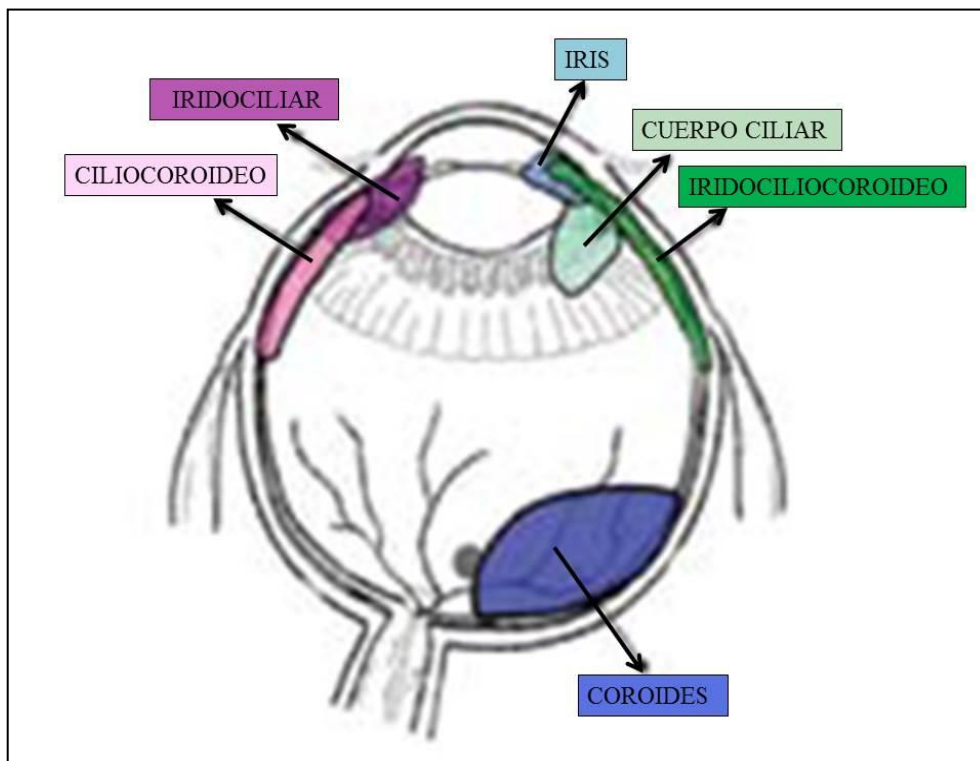


Figura. 31. Localización del tumor en la úvea.

1.5.- TAMAÑO DEL TUMOR

El tamaño de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar se determinó midiendo tanto la *extensión tumoral máxima* (máxima dimensión en contacto con la esclera o longitud del arco) como la *altura máxima del tumor* (dimensión desde el ápice de la lesión hasta la base del tumor en contacto con la esclera). Estas medidas fueron tomadas post-fijación en los cortes histológicos y expresadas en milímetros (*Fig. 32*).

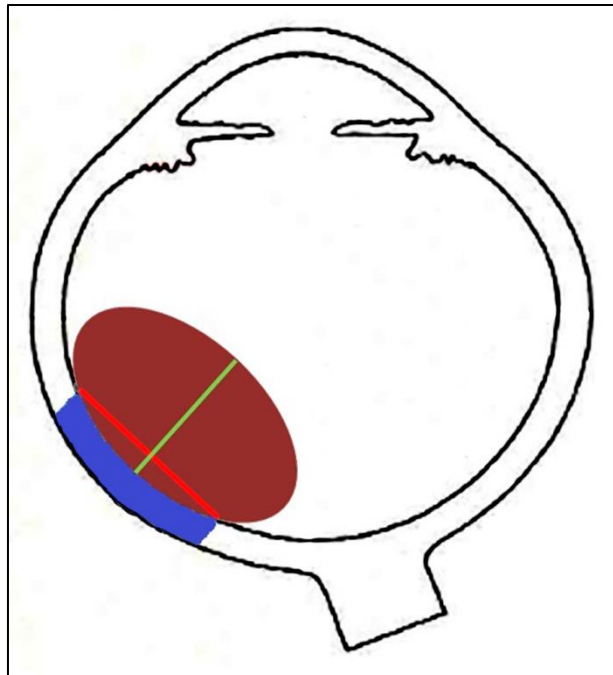


Figura 32. Determinación de los tamaños de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar (línea roja: longitud de la cuerda; línea verde: altura máxima; en azul: longitud del arco).

El tamaño de los melanomas de iris se precisó midiendo la extensión tumoral en horas de reloj o en grados (*Fig. 33*).

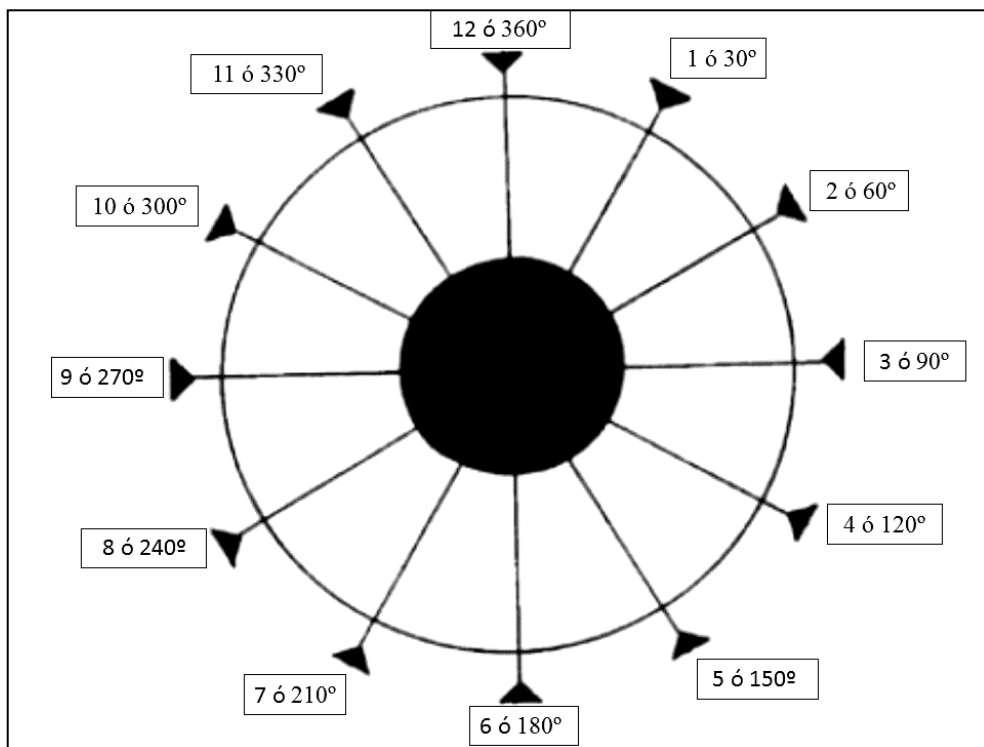


Figura 33. Medición del melanoma de iris en horas de reloj o en grados.

La clasificación por tamaños, en los casos de melanomas de coroides y cuerpo ciliar, se realizó en función de los criterios publicados por el Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS),⁹⁴ considerando:

- ❖ tumores pequeños los que tienen una altura máxima menor o igual a 2,5 mm y una dimensión basal máxima menor o igual a 16 mm;
- ❖ tumores medianos aquellos que tienen una altura máxima mayor de 2,5 mm y menor o igual a 10 mm y una dimensión basal máxima menor o igual a 16 mm, y
- ❖ tumores grandes los que tienen una altura máxima mayor de 10 mm o una dimensión basal máxima mayor de 16 mm.

1.6.- CATEGORÍA TUMORAL

En los melanomas de coroides y cuerpo ciliar se determinó, en primer lugar, la categoría T, basada en el tamaño tumoral (definido por la dimensión basal máxima y la altura) (*Tabla 2*).

ALTURA (mm)	CATEGORÍA						
>15	4	4	4	4	4	4	4
12-1-15	3	3	3	3	3	4	4
9.1-12	3	3	3	3	3	3	4
6-1-9	2	2	2	2	3	3	4
3.1-6	1	1	1	2	2	3	4
≤ 3	1	1	1	1	2	2	4
	≤ 3	3.1-6	6.1-9	9.1-12	12.1-15	15.1-18	>18
	DIMENSIÓN BASAL MÁXIMA (mm)						

Tabla 2. Clasificación de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar en cuatro categorías tumorales (AJCC, 7ª edición).

A continuación, en cada uno de los melanomas uveales estudiados se estableció la categoría TNM anatómica (*Tabla 3-5*). Recordemos que la estadificación de los melanomas de iris, según este sistema, es independiente de la de los melanomas uveales posteriores (melanoma de coroides y cuerpo ciliar).

TUMOR PRIMARIO	
TODOS LOS MELANOMAS UVEALES	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario

MELANOMA DE COROIDES Y CUERPO CILIAR	
T1	Tamaño tumoral de categoría 1
T1a	Tamaño tumoral de categoría 1 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T1b	Tamaño tumoral de categoría 1 con afectación del cuerpo ciliar
T1c	Tamaño tumoral de categoría 1 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T1d	Tamaño tumoral de categoría 1 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T2	Tamaño tumoral de categoría 2
T2a	Tamaño tumoral de categoría 2 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T2b	Tamaño tumoral de categoría 2 con afectación del cuerpo ciliar
T2c	Tamaño tumoral de categoría 2 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T2d	Tamaño tumoral de categoría 2 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T3	Tamaño tumoral de categoría 3
T3a	Tamaño tumoral de categoría 3 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T3b	Tamaño tumoral de categoría 3 con afectación del cuerpo ciliar
T3c	Tamaño tumoral de categoría 3 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T3d	Tamaño tumoral de categoría 3 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro

T4	Tamaño tumoral de categoría 4
T4a	Tamaño tumoral de categoría 4 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T4b	Tamaño tumoral de categoría 4 con afectación del cuerpo ciliar
T4c	Tamaño tumoral de categoría 4 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T4d	Tamaño tumoral de categoría 4 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T4e	Cualquier tamaño tumoral con extensión extraocular $>$ de 5 mm de diámetro
MELANOMA DE IRIS	
T1	Tumor limitado al iris
T1a	Tumor limitado al iris de tamaño \leq a 3 horas de reloj
T1b	Tumor limitado al iris de tamaño $>$ a 3 horas de reloj
T1c	Tumor limitado al iris con glaucoma secundario
T2	Tumor que confluye o se extiende al cuerpo ciliar y/o coroides
T2a	Tumor que confluye o se extiende al cuerpo ciliar y/o coroides, con glaucoma secundario
T3	Tumor que confluye o se extiende al cuerpo ciliar y/o coroides, con extensión escleral
T3a	Tumor que confluye o se extiende al cuerpo ciliar y/o coroides, con extensión escleral y glaucoma secundario
T4	Tumor con extensión extraescleral
T4a	Tumor con extensión extraescleral \leq de 5 mm de diámetro
T4b	Tumor con extensión extraescleral $>$ de 5 mm de diámetro

Tabla 3. Sistema de estadificación TNM para el melanoma uveal (7ª edición) -tumor primario (T).

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales

Tabla 4. Sistema de estadificación tnm para el melanoma uveal (7ª edición) -ganglios linfáticos regionales (N).

METÁSTASIS A DISTANCIA	
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis de mayor tamaño con diámetro \leq de 3 cm
M1b	Metástasis de mayor tamaño con diámetro entre 3,1-8 cm
M1c	Metástasis de mayor tamaño con diámetro \geq de 8 cm

Tabla 5. Sistema de estadificación tnm para el melanoma uveal (7ª edición) -metástasis a distancia (M).

1.7. ESTADIO SEGÚN EL SISTEMA TNM (7ª EDICIÓN, 2010)

Finalmente, en base a esta categoría TNM se reorganizaron en los diferentes estadios (Tabla 6).

ESTADIO ANATÓMICO/ GRUPOS PRONÓSTICOS			
ESTADIO	T	N	M
I	T1a	N0	M0
IIA	T1b-d	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIB	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIIA	T2c-d	N0	M0
	T3b-c	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIIB	T3d	N0	M0
	T4b-c	N0	M0
IIIC	T4d-e	N0	M0
IV	Cualquier T	N1	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1a-c

Tabla 6. Estadios según el sistema TNM para el melanoma uveal (7ª edición).

1.8.- EVOLUCIÓN CLÍNICA:

De las historias clínicas se obtuvieron los siguientes datos:

- ❖ **Tiempo de seguimiento:** se calculó en meses, desde el momento de la intervención quirúrgica hasta la última revisión clínica o fallecimiento del paciente.
- ❖ El **tiempo libre de enfermedad** (TLE, expresado en meses) se calculó hallando la diferencia entre la fecha de inicio de seguimiento (fecha de intervención quirúrgica) y la fecha del primer evento positivo detectado en la historia clínica (recidiva o metástasis). Definimos la recidiva como aparición

de tumor después de la intervención inicial. En caso de no existir recidiva ni metástasis, este intervalo coincidió con el tiempo de seguimiento.

- ❖ La **supervivencia global** (expresada en meses) se calculó asimismo a partir de la fecha de inicio de seguimiento (fecha de intervención quirúrgica) y la fecha de éxitus o la fecha de la última revisión.

2.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histopatológico se examinaron las piezas quirúrgicas, que habían sido fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en su totalidad de forma rutinaria en parafina.

De cada caso, se revisaron todas las preparaciones disponibles (entre 3 y 13) para el estudio de las características tumorales, eligiéndose la muestra más representativa para el estudio inmunohistoquímico. Las muestras histopatológicas fueron analizadas bajo el microscopio óptico (Carl Zeiss, modelo Axioskop 2) y valoradas por dos patólogos sin conocimiento de la evolución clínica de los pacientes. Los casos en los que hubo discrepancia se revisaron conjuntamente para alcanzar un consenso.

Las diferentes características evaluadas fueron las siguientes:

2.1.- TIPO HISTOLÓGICO:

Atendiendo al tipo histopatológico los melanomas uveales fueron clasificados como:

- ❖ Melanoma de células fusiformes (*Fig. 61A*):
 - Aquellos con más del 90% de células fusiformes.
 - Patrón cito-histológico fasciculado (haces gruesos, entrelazados), cohesivo, sincitial.

- Citoplasma escaso, aunque puede ser relativamente abundante, y de límites imprecisos.
- Núcleo alargado (morfología fusiforme).
- Presencia de hendidura longitudinal o nucléolo poco aparente.
- Uniformemente pigmentados.

❖ Melanoma de células epitelioides (*Fig. 61B*):

- Aquellos con más del 90% de células epitelioides.
- Patrón no fasciculado, pérdida de cohesión o patrón falsamente cohesivo.
- Células de forma redonda o poliédrica.
- Citoplasma abundante y eosinófilo, límite celular preciso, membrana celular patente.
- Núcleo redondo, central y grande. Monotonía nuclear.
- Nucléolo central, eosinófilo y prominente.
- Con frecuencia pseudoinclusiones.
- Suelen estar menos pigmentados que el melanoma de células fusiformes.

❖ Melanoma de células intermedias (*Fig. 61C*):

- No presentan un patrón claro ni de células fusiformes ni de células epitelioides.
- Células fusiformes a las que les falta cohesión, con menos disposición sincitial (células individualizables).
- Células poliédricas más cohesivas.
- No presentan hendiduras.

- Nucléolos ocasionales.
- Presencia de necrosis.
- Pleomorfismo: variabilidad en el tamaño, células gigantes, multinucleadas.
- Irregularidad nuclear y citoplásmica: Aspecto sarcomatoide.

❖ Melanoma mixto (de células fusiformes y epitelioides) (*Fig. 61D*):

- Aquellos con menos del 90% de células fusiformes y más del 10% de células epitelioides.
- Buena delimitación entre ambos componentes.
- En general, nódulo de células epitelioides y amplias zonas de células fusiformes.

2.2.- PATRÓN DE CRECIMIENTO:

Los diferentes casos estudiados se clasificaron según los siguientes patrones de crecimiento macroscópico (pudiéndose evaluar también dichos patrones en los cortes histopatológicos) (*Fig. 34*):

❖ ***Patrón focal***: Aquellos melanomas que mostraron una masa sólida circunscrita.

❖ ***Patrón difuso (plano)***: Nuestros criterios de selección específicos para clasificar un melanoma uveal como difuso fueron: 1) melanoma primario de úvea; 2) afectación de al menos un cuarto de úvea observable en el plano de corte; y 3) patrón de crecimiento plano y altura que no exceda los 7 mm.

- ❖ **Patrón difuso en anillo** (“ring melanoma”): Los melanomas clasificados con este tipo de patrón cumplieron los criterios anteriormente expuestos del patrón difuso pero afectaban circunferencialmente a la úvea al menos 180° (6 o más horas de reloj).

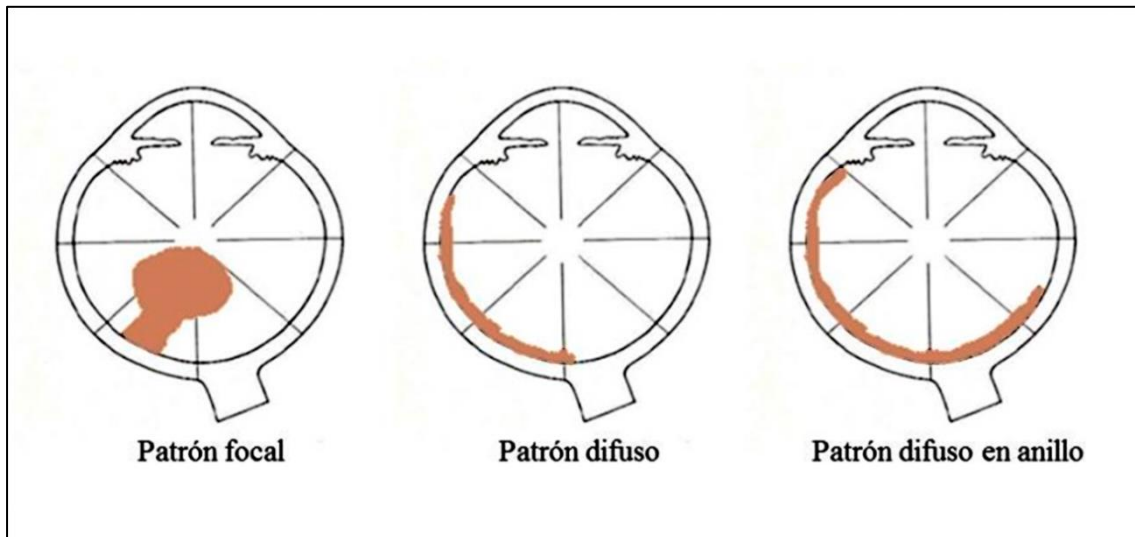


Figura 34. *Patrones de crecimiento tumoral.*

2.3.- GRADO DE PIGMENTACIÓN:

El grado de pigmentación de cada tumor (*Fig. 35*) se graduó como:

- ❖ Ninguno o amelanótico
- ❖ Escaso
- ❖ Abundante

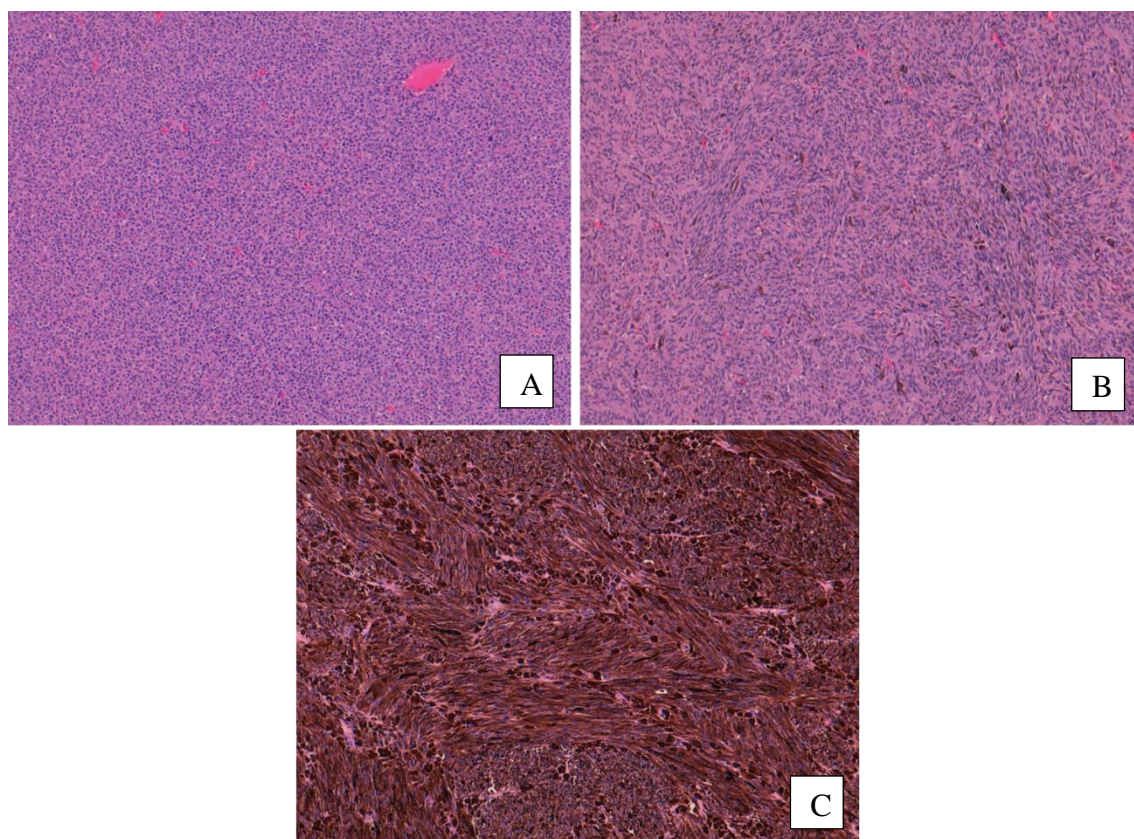


Figura 35. Grados de pigmentación (HE, 10x): A) melanoma amelanótico; B) melanoma con pigmentación escasa; C) melanoma con abundante pigmentación.

2.4.- NECROSIS:

La necrosis se graduó según el porcentaje de la misma en los diferentes cortes evaluados como:

- ❖ Ausente
- ❖ $\leq 50\%$ del tumor
- ❖ $>50\%$ del tumor

2.5.- ÍNDICE DE MITOSIS:

La actividad mitótica se evaluó contando el número de mitosis en 40 campos consecutivos de gran aumento (40x).

2.6.- AFECTACIÓN DEL CUERPO CILIAR:

La afectación del cuerpo ciliar (*Fig.68*) se valoró examinando todos los cortes histológicos que de rutina deben incluir ambos cuerpos ciliares y se contempló en cada uno de los casos como:

❖ Presente

❖ Ausente

2.7.- AFECTACIÓN ESCLERAL:

El grado de invasión tumoral de la esclera se graduó en cada melanoma uveal como:

❖ Ninguna.

❖ Intraescleral: Si las células tumorales estaban presentes dentro del espesor de la esclera. La invasión emisaria y la invasión de las capas esclerales más internas, ya sea como sábanas” o células individuales también se consideró invasión intraescleral (*Fig.36*).

❖ Extraescleral: Definida cuando el tumor se extendía más allá de la superficie escleral más externa, es decir, rebasaba la esclera (*Fig.37*).

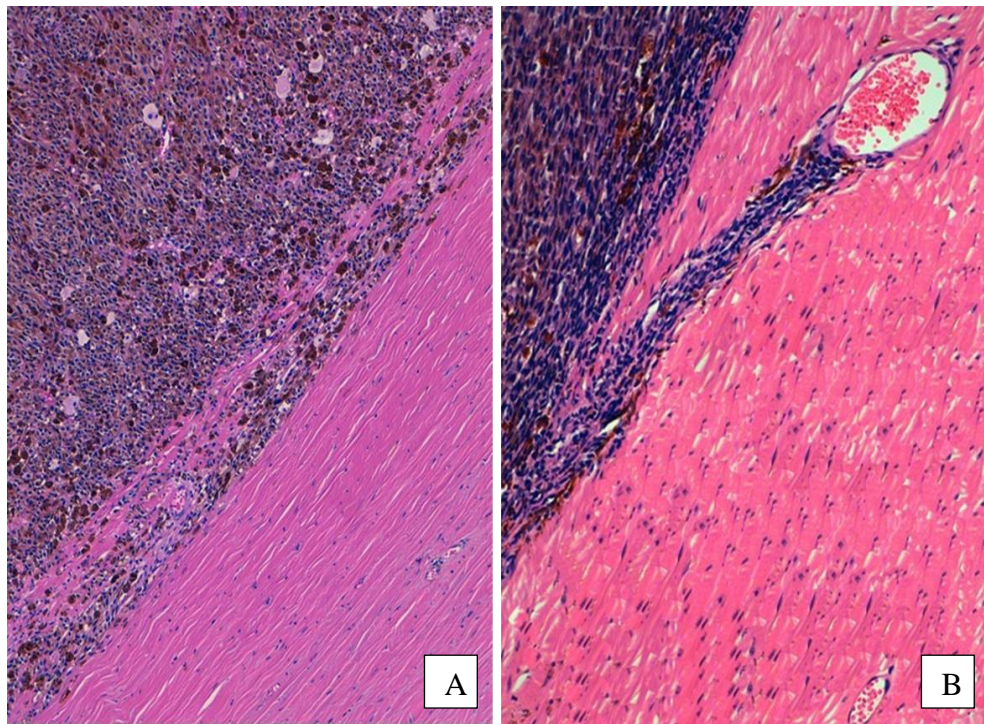


Figura 36. *Afectación intraescleral (HE, 10x): A) invasion de las capas de esclera más internas; B) invasión emisaria.*

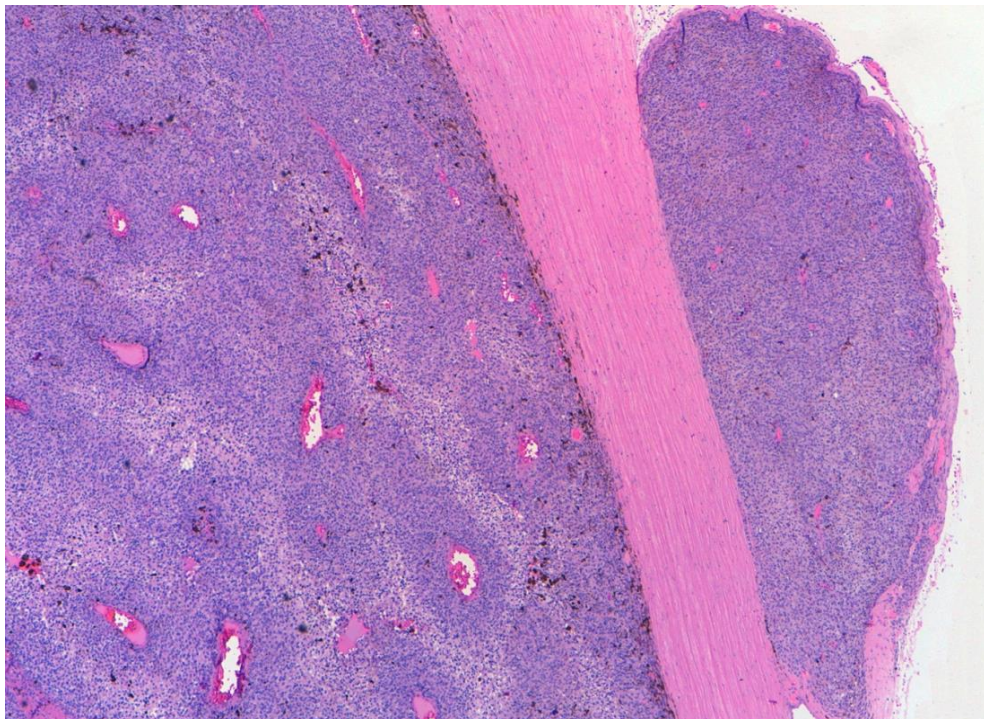


Figura 37. *Afectación extraescleral (HE 4x).*

2.8.- INVASIÓN VASCULAR:

Hemos considerado tanto la invasión arterial (arterias ciliares) como la venosa (venas vorticosas) en sus porciones intraescleral como extraescleral.

La invasión vascular se registró en cada caso como:

- ❖ Presente
- ❖ Ausente

2.9.- INVASIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO:

El grado de invasión del nervio óptico (*Fig.38*) se determinó como:

- ❖ Ausente
- ❖ Invasión prelaminar o laminar: definida como la presencia de células tumorales en la cabeza del nervio óptico y/o en la lámina cribosa.
- ❖ Invasión postlaminar: si las células tumorales estaban presentes en el nervio óptico y/o en sus envolturas más allá de la lámina cribosa en sentido centrípeto.

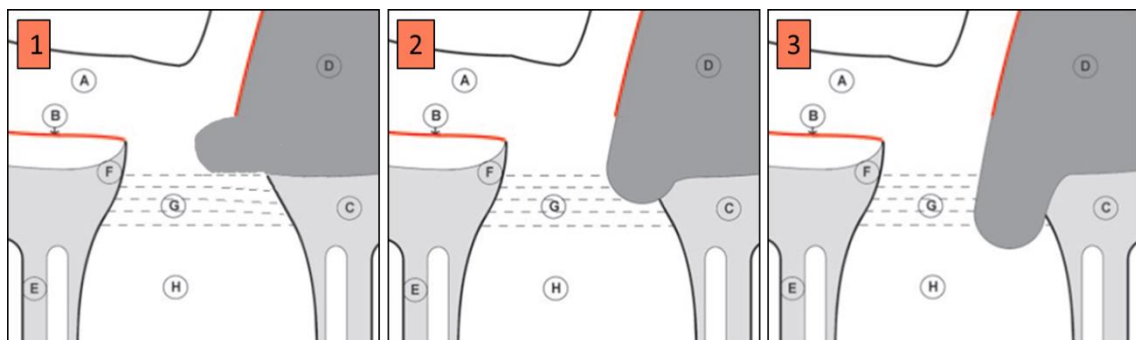


Figura 38. Melanoma de coroides invadiendo el nervio óptico. 1: invasión prelaminar; 2: invasión laminar; 3: invasión postlaminar. A) retina; B) membrana de Bruch; C) esclera; D) melanoma; E) duramadre; F) tejido limitante de Elschnig; G) lámina cribosa; H) nervio óptico.

3.- PROCEDIMIENTO PARA LA DESPIGMENTACIÓN DE LAS SECCIONES HISTOLÓGICAS

En los melanomas uveales que presentaron grado de pigmentación abundante los depósitos de melanina plantearon serias dificultades para el recuento de mitosis así como para la valoración de los resultados inmunohistoquímicos empleando el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System. Este kit de detección emplea un sistema indirecto de estreptavidina-biotina para visualizar los anticuerpos específicos que son localizados por un cóctel de anticuerpos secundarios marcados con enzima. El complejo formado se visualiza con un sustrato de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3, 3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) que produce un precipitado de color marrón, en el sitio de unión del anticuerpo específico, fácilmente detectable mediante microscopía óptica. Sin embargo, en tumores pigmentados este precipitado de color marrón es difícil de distinguir del pigmento melánico (*Fig.39*). Para superar estos inconvenientes procedimos a ensayar los distintos procedimientos de blanqueamiento de melanina descritos en la literatura²⁸⁵⁻²⁹⁶ y comparar los resultados:

3.1.- MÉTODO CON PERMANGANATO POTÁSICO:

Este método consta de los siguientes pasos:

1º Desparafinar los cortes histológicos e hidratar en agua.

2º Lavar en agua destilada.

3º Poner en una solución de permanganato potásico acuoso al 0,25% durante ½ – 2 horas (se ensayaron los siguientes intervalos de tiempo: 30 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos y 2 horas).

4º Lavar bien en agua destilada.

5º Poner en una solución acuosa de ácido oxálico al 1% durante un minuto.

6º Lavar en agua corriente durante 10 minutos, seguido de agua destilada.

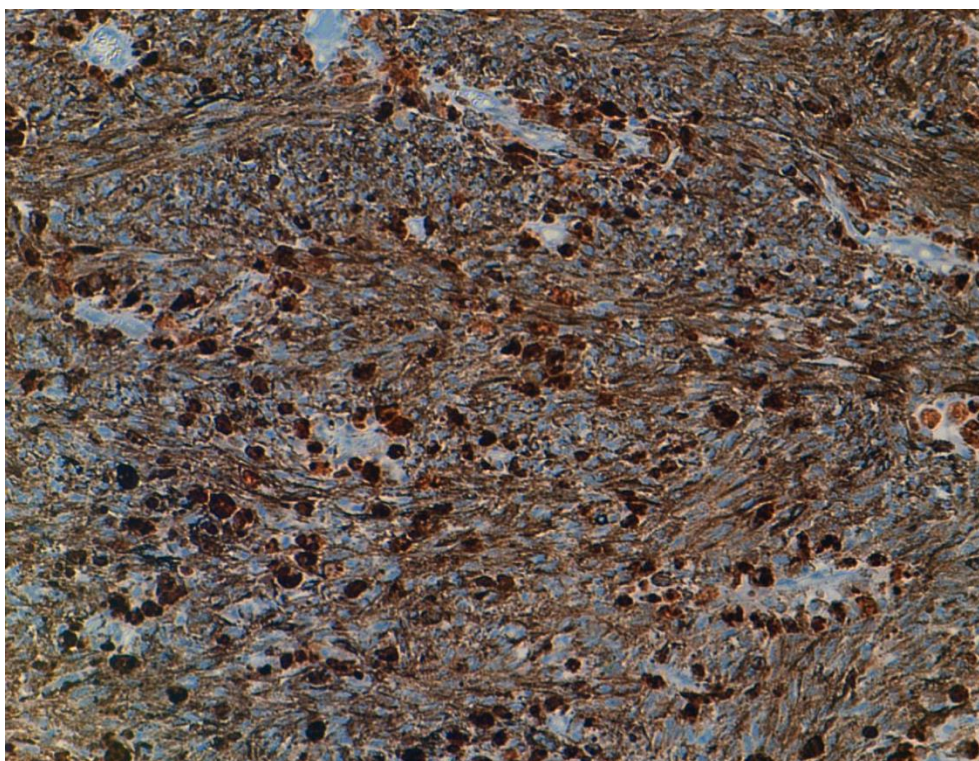


Figura 39. Expresión anti-Ki67 empleando el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System (10x).

Una vez completados los pasos descritos realizamos la técnica de inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System según el protocolo establecido eliminando el horneado y el desparafinado. Aun así, se observó una pérdida importante del tejido.

3.2.- MÉTODO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO DILUIDO

Se procedió al blanqueamiento de melanina empleando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Foret® al 30% (p./v.) 110 volúmenes diluido al 10% o 3% con los siguientes diluyentes:

- ❖ tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline);
- ❖ fosfato disódico de hidrógeno al 1% (Na_2HPO_4);
- ❖ tampón fosfato o buffer fosfato (PB), y

❖ agua destilada.

Los cortes histológicos correspondientes a tumores pigmentados y tumor amelanótico (utilizado como control) fueron incubados en cada uno de estos diluyentes a temperatura ambiente durante 16, 18, 20, 22 y 24 horas.

Tras el blanqueamiento se procedió a la tinción con HE en uno de los cortes histológicos y en otros se realizaron las técnicas de inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System excluyendo del protocolo establecido el horneado y desparafinado.

El blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluido en PBS o PB a temperatura ambiente durante 18 horas fue superior al blanqueamiento utilizando como diluyente el fosfato disódico de hidrógeno o agua destilada en términos de preservación del tejido y de los detalles citológicos (*Fig.40-42*).

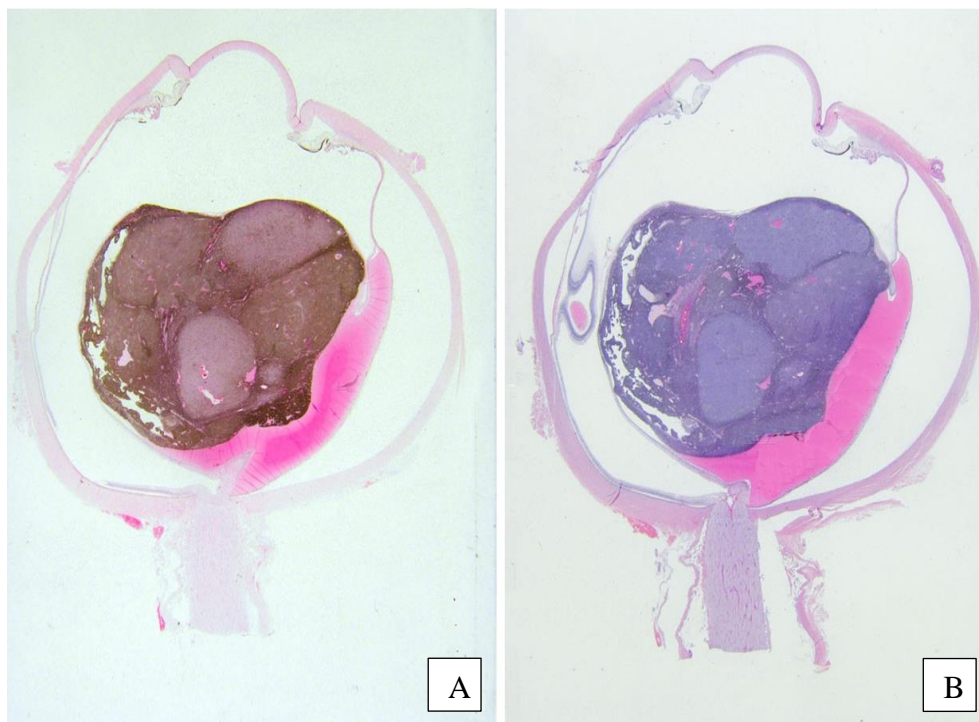


Figura 40. Método de blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluido en PBS a temperatura ambiente durante 18 horas: A) melanoma de coroides previo al blanqueamiento; B) melanoma de coroides tras el blanqueamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

En los tumores pigmentados fue útil para el recuento de mitosis blanquear los cortes histológicos con H_2O_2 al 10% diluido con PB a temperatura ambiente durante 18 horas y tras ello teñir con HE. Sin embargo, en ninguno de los procedimientos de blanqueamiento con H_2O_2 ensayados se consiguió una despigmentación totalmente completa y los resultados inmunohistoquímicos con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System excluyendo del protocolo establecido el horneado y desparafinado no fueron óptimos en ninguno de ellos.

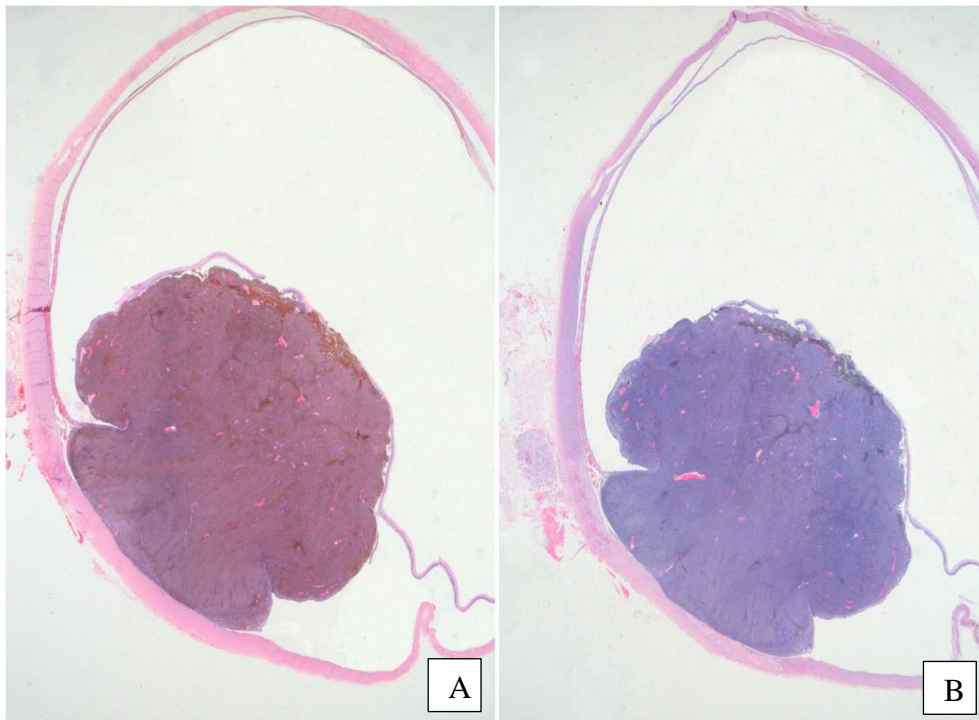


Figura 41. Método de blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluido en PB a temperatura ambiente durante 18 horas: A) melanoma de coroides previo al blanqueamiento; B) melanoma de coroides tras el blanqueamiento.

Invirtiendo las técnicas, es decir, realizando en primer lugar la técnica de inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System seguida de la técnica de blanqueamiento de melanina (con permanganato potásico acuoso al 0,25% o bien con H_2O_2 al 10% diluido con PB durante 18 horas a temperatura ambiente) se consiguió eliminar el pigmento melánico pero el precipitado marrón de la DAB se decoloraba.

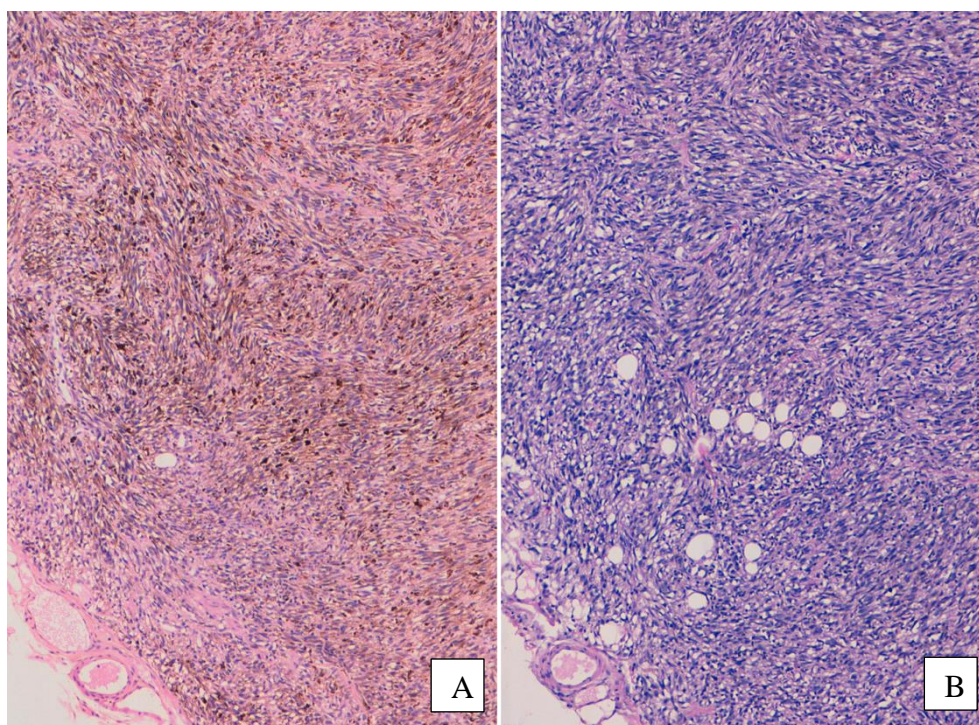


Figura 42. Método de blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluido en PB a temperatura ambiente durante 18 horas. A) melanoma pigmentado previo al blanqueamiento; B) melanoma pigmentado tras el blanqueamiento (HE, 40x).

Para la realización del estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-Ki67 ensayamos previamente las siguientes técnicas de blanqueamiento:

- ❖ Solución de permanganato potásico acuoso al 0,25% durante 20 minutos y ácido oxálico 1% durante 5 minutos. Lavado con agua destilada durante 24 horas.
- ❖ Solución de permanganato potásico al 0,25% durante 30 minutos y ácido oxálico 5% durante 5 minutos. Lavado con agua corriente durante 5 minutos y agua destilada durante 5 minutos.
- ❖ H_2O_2 al 10% diluida con Na_2HPO_4 o PBS o PB durante 18 horas a temperatura ambiente y posterior lavado con agua destilada durante 24 horas.
- ❖ H_2O_2 al 3% diluida con Na_2HPO_4 o PBS o PB durante 18 horas a temperatura ambiente y posterior lavado con agua destilada durante 1 hora.

- ❖ H_2O_2 al 10% diluida con Na_2HPO_4 o PBS o PB durante 18 horas a temperatura ambiente y posterior lavado con agua corriente durante 5 minutos, 3 pases en agua destilada y lavado final con ácido acético al 1% durante 2 minutos.
- ❖ H_2O_2 al 3% diluida con Na_2HPO_4 o PBS o PB durante 18 horas a temperatura ambiente y posterior lavado con agua corriente durante 5 minutos, 3 pases en agua destilada y lavado final con ácido acético al 1% durante 2 minutos.

Tras estas técnicas de blanqueamiento se procedió a la realización de la técnica inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System con el anticuerpo anti-Ki67 presentado todas las células inmunorreacción positiva para anti-Ki67 (*Fig. 43*).

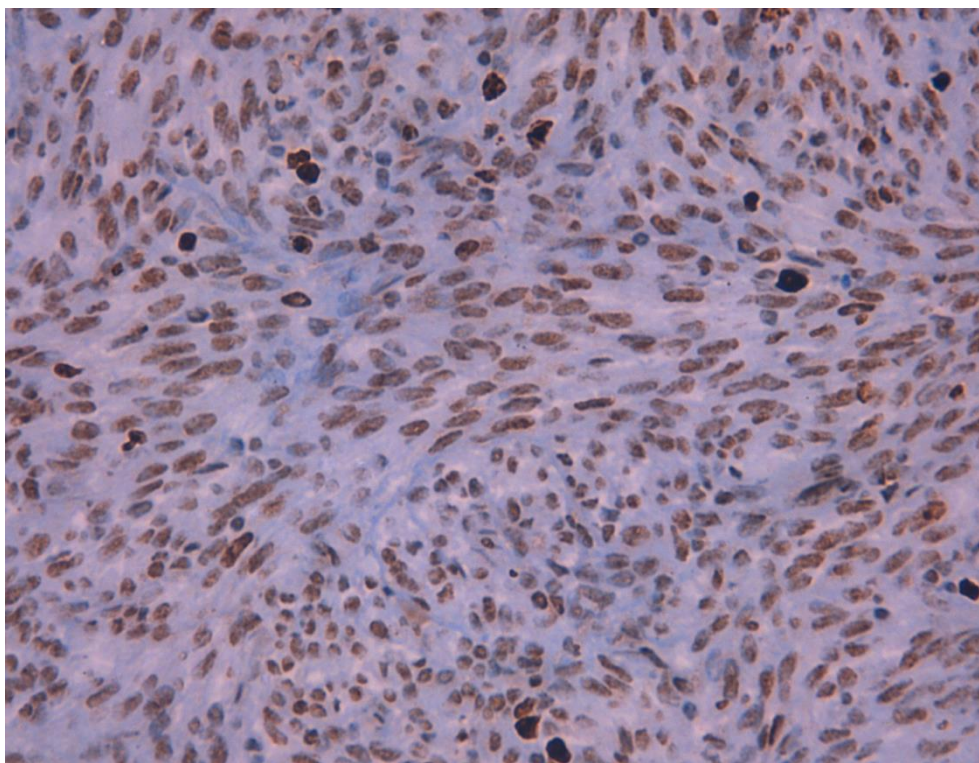


Figura 43. Expresión de anti-Ki67 con el kit de detección ultraView Universal DAB tras blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluido con PBS (40x).

Realizando en primer lugar la recuperación antigénica seguida de la técnica de blanqueamiento con H_2O_2 al 10% diluida con Na_2HPO_4 o PBS o PB durante 18 horas a temperatura ambiente y en tercer lugar la reacción antígeno-anticuerpo obtuvimos similares resultados a los anteriormente descritos.

Ante estos resultados recomendamos para el estudio de melanomas uveales pigmentados el siguiente protocolo de blanqueamiento de melanina para facilitar el recuento de mitosis (*Tabla 7*) y la realización del estudio inmunohistoquímico mediante el sistema de detección con fosfatasa alcalina.

PROTOCOLO DE BLANQUEAMIENTO DE MELANINA PARA EL RECuento DE MITOSIS EN TUMORES PIGMENTADOS	
1°	Desparafinar los cortes histológicos: Introducir en estufa a 60°C durante 20-30 minutos y sumergir en 2 baños sucesivos de xilol durante 15 y 5 minutos respectivamente
2°	Hidratar los cortes histológicos en baños decrecientes de alcohol: <ul style="list-style-type: none"> • Alcohol 100° (10 pasadas) • Alcohol 95° (10 pasadas) • Alcohol 80° (10 pasadas) • Alcohol 70° (10 pasadas)
3°	Lavar en agua corriente durante 5 minutos y 3 pases en agua destilada
4°	Incubar los cortes histológicos en H_2O_2 diluida al 10% con tampón fosfato (PB) durante 18 horas a temperatura ambiente
5°	Lavar en agua corriente durante 5 minutos y 3 pases en agua destilada
6°	Teñir con HE

Tabla 7. Protocolo de blanqueamiento de melanina para el recuento de mitosis en tumores pigmentados.

4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.1.- SISTEMA DE DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON FOSFATASA ALCALINA

Para evitar las dificultades de interpretación debidas a la melanina optamos por realizar el estudio inmunohistoquímico empleando el kit de detección ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red de Ventana Medical System para la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo. Este kit emplea un método indirecto para visualizar anticuerpos específicos unidos a antígenos. Utiliza un cóctel de anticuerpos secundarios marcados con enzima que localizan el anticuerpo primario unido al antígeno. A continuación, el complejo se visualiza con Naftol y el cromógeno Fast Red, que produce un precipitado rojo fácilmente detectable mediante microscopía óptica y que permite distinguirlo de la melanina (*Fig 44-45*). El protocolo de tinción conlleva numerosos pasos en los que los reactivos son incubados durante tiempos predeterminados a temperaturas específicas. Al final de cada paso de incubación, el módulo de tinción de Ventana BenchMark Ultra lava los cortes para retirar el material no ligado y aplica un cubreobjetos líquido (solución cubreobjetos) que al actuar como barrera entre los reactivos acuosos y el aire minimiza la evaporación de dichos reactivos del portaobjetos.

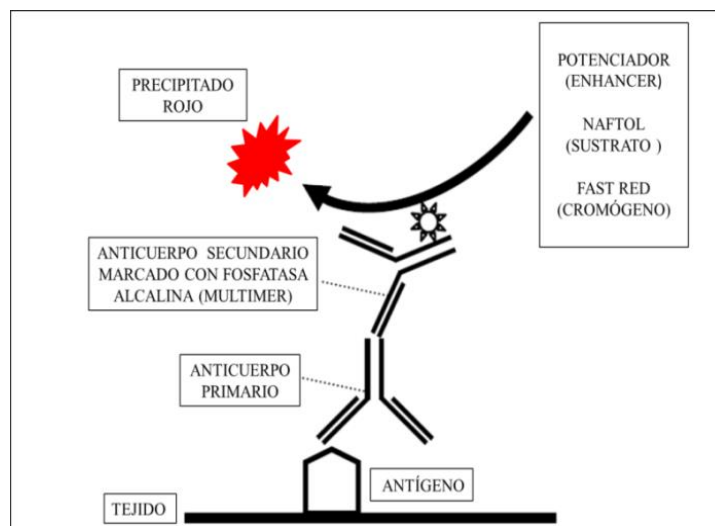


Figura 44. Método de detección indirecto del ultraView Universal Alkaline Phosphatase detection kit.

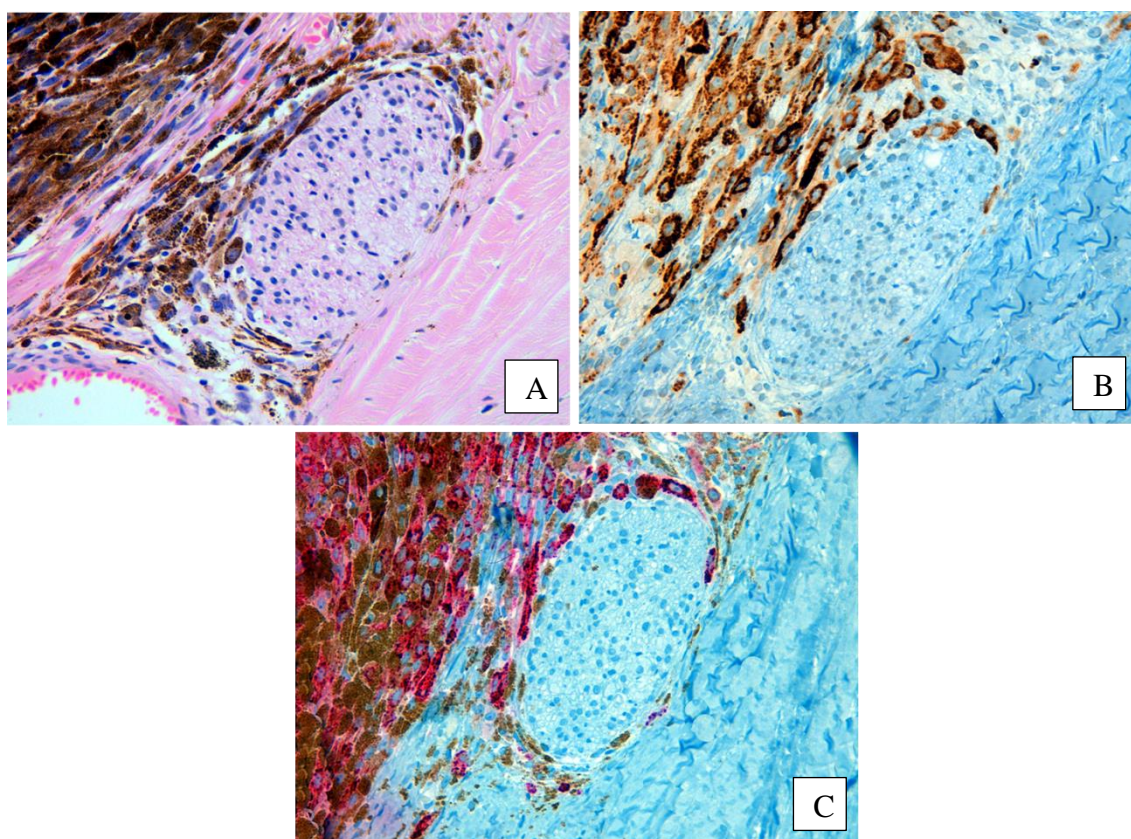


Figura 45. Melanoma de coroides con invasión intraescleral y perineural: A) HE, 40x; B) expresión anti-HMB-45 con kit de detección ultraView Universal DAB, 40x; C) expresión de anti-HMB-45 con kit de detección ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red, 40x.

4.2.- ANTICUERPOS

En cada bloque seleccionado se realizaron cortes consecutivos de 3 micras que se recogieron en portaobjetos silanizados (portaobjetos con carga positiva) para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas. En la *Tabla 8* aparecen relacionados los diferentes anticuerpos primarios utilizados con la correspondiente clona, tipo de anticuerpo, dilución, proveedor y patrón de tinción.

ANTICUERPO	CLONA	TIPO DE ANTICUERPO	DILUCIÓN	PROVEEDOR	PATRÓN DE TINCIÓN
Anti-CD68	KP-1	Monoclonal de ratón de clase IgG ₁ kappa	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Citoplasma/ Membrana
Anti-CD163	MRQ-26	Monoclonal de ratón isotipo IgG ₁	Prediluido	Cell Marque Corporation USA	Citoplasma/ Membrana
Anti-CD3	2GV6	Monoclonal de conejo (IgG)	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Citoplasma/ Membrana
Anti-CD4	SP35	Monoclonal de conejo	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Membrana
Anti-CD8	SP57	Monoclonal de conejo	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Membrana
Anti-FOXP3	236A/E7	Monoclonal de ratón	1:100	Abcam	Nuclear
Anti-CD56	123C3	Monoclonal de ratón (IgG ₁)	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Citoplasma/ Membrana
Anti-CD20	L26	Monoclonal de ratón (IgG _{2a} , kappa)	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Membrana
Anti-Ki67	30-9	Monoclonal de conejo (IgG)	Prediluido	Ventana Medical System, Inc	Nuclear

Tabla 8. Características de los anticuerpos primarios utilizados.

4.3.- PROTOCOLOS DE TINCIÓN

Las técnicas inmunohistoquímicas se llevaron a cabo en el módulo de tinción automatizado BenchMark Ultra de Ventana. Los protocolos de tinción para los distintos anticuerpos primarios empleados se muestran en las *Tablas 9-17*.

Para garantizar la fiabilidad de la técnica, en cada serie de tinción se llevó un control positivo previamente contrastado del que se conocía la intensidad de tinción, así como negativo en el que se sustituyó el anticuerpo primario específico por suero normal.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD68				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				64 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD68 (KP-1)	Tiempo de incubación intermedio	36 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 9. Protocolo de tinción para anti-CD68.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD163				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				76 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD163 (MRQ-26)	Tiempo de incubación intermedio	1h	
	DETECCIÓN REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 10. Protocolo de tinción para anti-CD163.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD3				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	75°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				20 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD3 (2GV6)	Tiempo de incubación intermedio	36 min	
	DETECCIÓN REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 11. Protocolo de tinción para anti-CD3.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD4				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				52 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD4 (SP35)	Tiempo de incubación intermedio	44 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 12. Protocolo de tinción para anti-CD4.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD8				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				20 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD8 (SP57)	Tiempo de incubación intermedio	40 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 13. Protocolo de tinción para anti-CD8.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-FOXP3				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				64 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-FOXP3 (236A/E7)	Tiempo de incubación intermedio	48 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 14. Protocolo de tinción para anti-Foxp3.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD56				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	75°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				52 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD56(123C3)	Tiempo de incubación intermedio	36 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	8 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 15. Protocolo de tinción para anti-CD56.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-CD20				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	75°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				20 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti-CD20 (L26)	Tiempo de incubación intermedio	16 min	
	DETECCION REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 16. Protocolo de tinción para anti-CD20.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA ANTI-Ki67				
TIPO DE PROCEDIMIENTO	HORNEADO	Temperatura del medio	72°C	
		Tiempo de incubación	4 min	
	DESPARAFINADO	Temperatura del medio	72°C	
	ACONDICIONADOR CELULAR (Desenmascaramiento celular)	Ultra Conditioner #1	Acondicionador celular N°1	Temperatura muy alta 95°C e incubar 8 min
				52 min de ULTRA CC1
	ANTICUERPO anti- Ki67 (30-9)	Tiempo de incubación intermedio	24 min	
	DETECCIÓN REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO (Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit)	Ultraview Universal AP Red Multimer	Tiempo de incubación	12 min
		Ultraview Universal AP Red Enhancer	Tiempo de incubación	4 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red A y Ultraview Universal AP Red Naphthol	Tiempo de incubación	8 min
		Ultraview Universal AP Red Fast Red B	Tiempo de incubación	8 min
	CONTRATINCIÓN (Hematoxilina)	Tiempo de incubación	4 min	
	POST-CONTRATINCIÓN (Bluing reagent)	Tiempo de incubación	4 min	

Tabla 17. Protocolo de tinción para anti-Ki67.

Tras completar el ciclo de tinción y retirar los portaobjetos del módulo de tinción automatizado, efectuamos los siguientes pasos para el montaje de las preparaciones:

1. Lavar los portaobjetos con un detergente suave para lavavajillas (agua jabonosa) para eliminar la solución cubreobjetos (cubreobjetos líquido).
2. Aclarar los portaobjetos con agua + agua destilada durante un minuto aproximadamente para quitar el detergente. Sacudir el exceso de agua.
3. Secar los portaobjetos en una estufa a 45-60°C durante 15-20 minutos o secar a temperatura ambiente. Comprobar que los portaobjetos estén completamente secos antes de cubrirlos. El cromógeno Fast Red es soluble en alcohol y en acetona, por ello no debemos utilizar baños de alcohol, acetona o xilol prolongados para deshidratar y limpiar los portaobjetos.
4. Pases por xilol.
5. Colocar el cubreobjetos en el portaobjetos utilizando un medio de montaje permanente (DPX).

4.4.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

4.4.1.- ANTICUERPO ANTI-CD68

Las células que mostraron inmunorreacción positiva para anti-CD68 variaron no sólo en el número sino también en la morfología y la disposición. Definimos como melanófagos a células de mayor tamaño, mucho más pigmentadas que el resto, con tanta cantidad de melanina que la inmunotinción con fosfatasa alcalina y el cromógeno Fast Red daba poca reacción o al menos no se percibía con claridad y que generalmente se disponían en grandes masas. Para la valoración de resultados fueron excluidas ya que formaban, por lo general, masas periféricas, ajenas al microambiente de la célula (*Fig.46*).

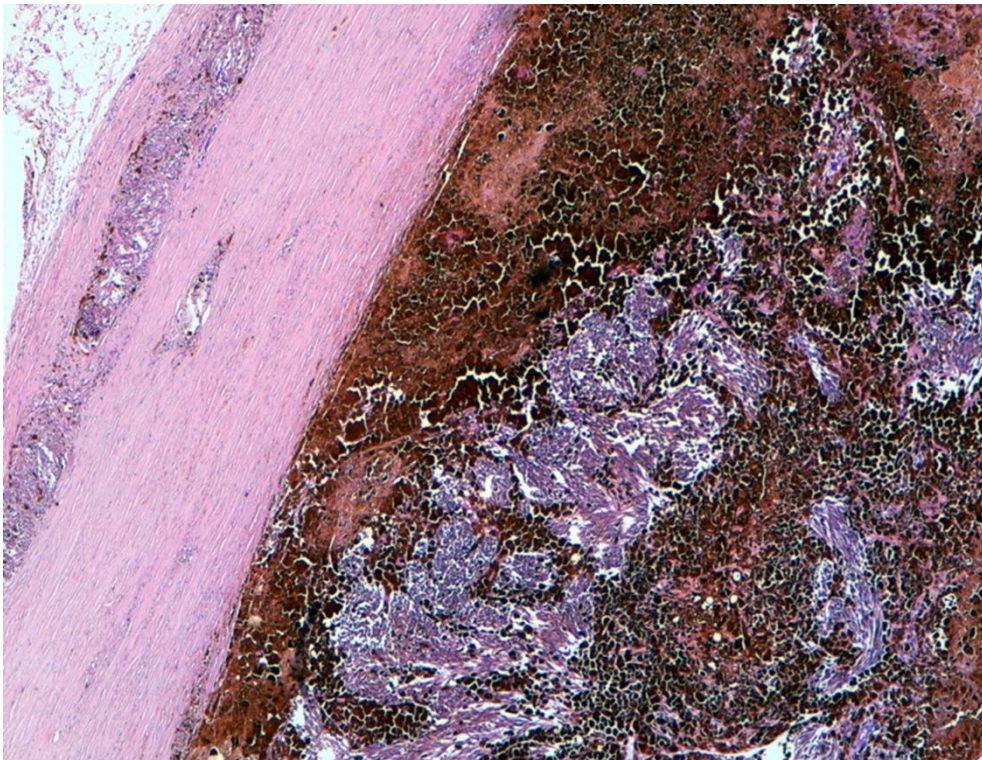


Figura 46. Melanoma de coroides con invasión intraescleral y gran cantidad de melanófagos (HE, 4x).

Desde el punto de vista morfológico pudimos distinguir entre células redondas y otras de hábito dendrítico. Estos tipos de células se encontraban inmersas entre las células tumorales. Los tumores se dividieron semicuantitativamente en dos grupos basándonos en el tipo predominante de células inmunorreactivas con anti-CD68: redondas o de hábito dendrítico (*Fig.47*).

Atendiendo al número total de células con inmunotinción positiva para anti-CD68 (incluyendo células redondas y de hábito dendrítico) los tumores se graduaron como (*Fig.48*):

- ❖ (1+): escasas células inmunopositivas para anti-CD68.
- ❖ (2+): numerosas células inmunopositivas para anti-CD68.
- ❖ (3+): muy abundantes células inmunopositivas para anti-CD68.

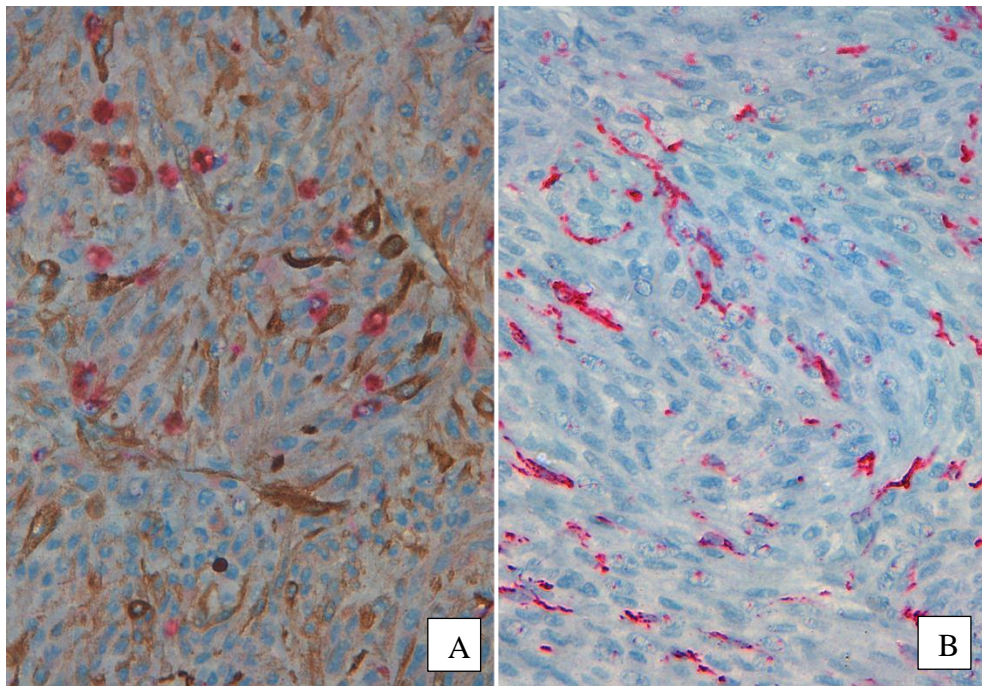


Figura 47. Tipo predominante de células anti-CD68 (40x): A) tipo redondo; B) de hábito dendrítico.

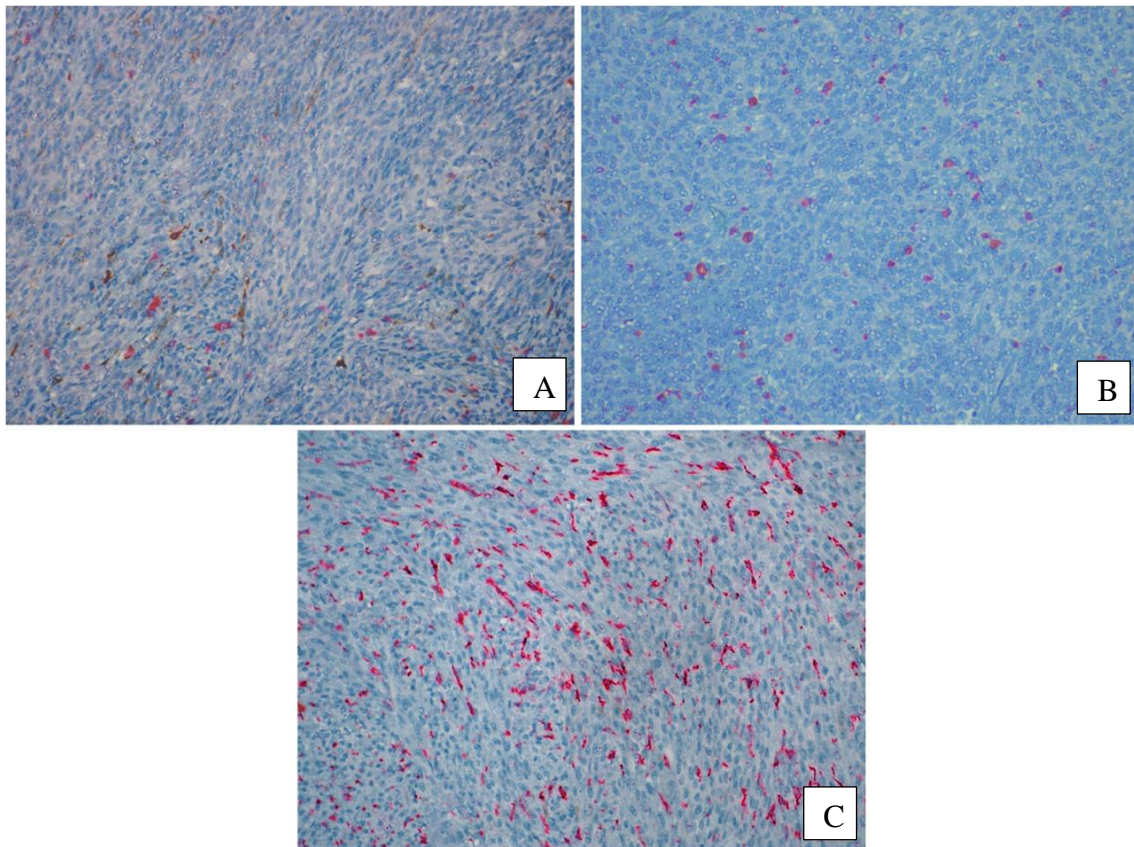


Figura 48. Inmunoeexpresión anti-CD68 (20x): A) (1+); B) (2+) y C) (3+.)

Finalmente se establecieron en los tumores graduados como (2+) y (3+) tres patrones predominantes de disposición de las células inmunopositivas con anti-CD68 (*Fig.49*):

- ❖ Patrón perivascular.
- ❖ Patrón de células dispersas.
- ❖ Patrón difuso con formación de mallas celulares.

Los tumores graduados como (1+) no llevaban consigo un patrón de disposición definido.

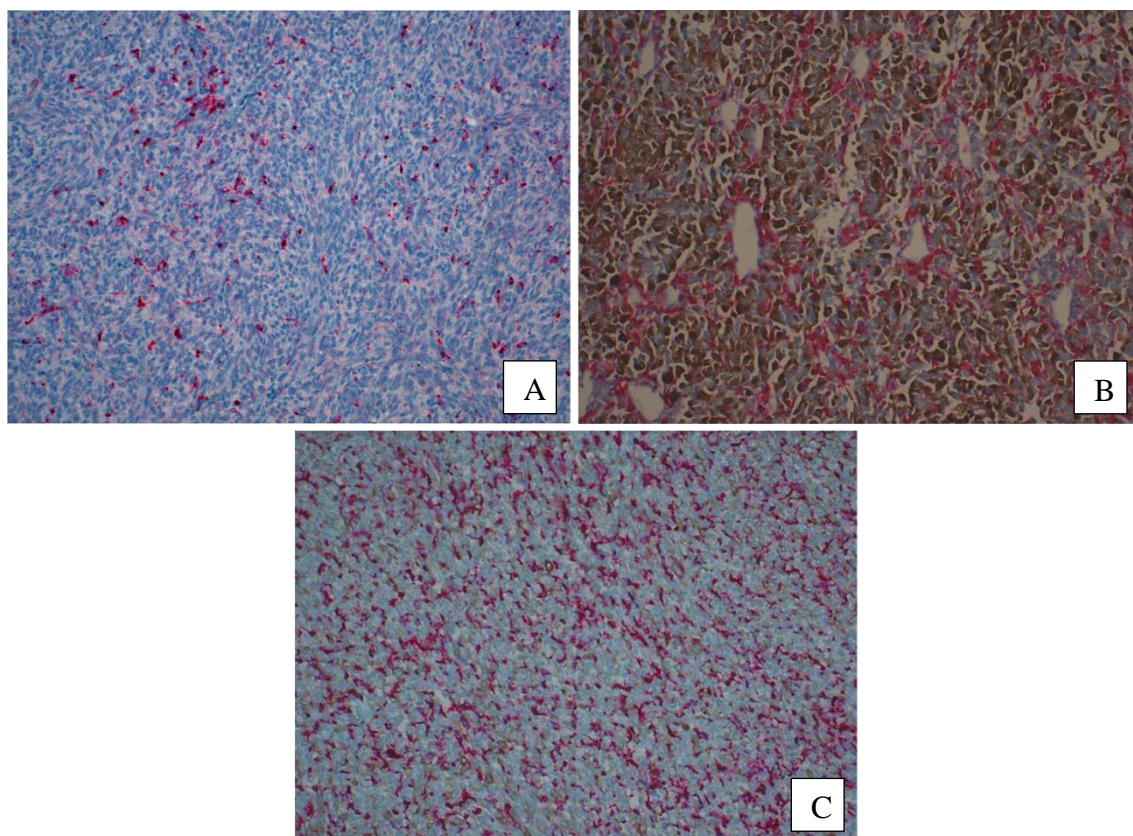


Figura 49. Patrones de inmunoexpresión anti-CD68 (20x): A) patrón perivascular; B) patrón de células dispersas y C) patrón difuso con formación de mallas celulares.

Tanto para la valoración de los resultados inmunohistoquímicos para anti-CD68 como para el resto de los anticuerpos ensayados se excluyeron las zonas perihemorrágicas y necróticas.

En resumen, los criterios de evaluación de resultados inmunohistoquímicos para anti-CD68 fueron:

- ❖ Excluir los melanófagos.
- ❖ Determinar el tipo predominante de células anti-CD68 positivas: redondas o de hábito dendrítico.
- ❖ Graduar el número total de células redondas y de hábito dendrítico anti-CD68 positivas en (1+), (2+) o (3+).
- ❖ Establecer el patrón predominante de distribución de las células anti-CD68 positivas: perivascular, de células dispersas y difuso con formación de mallas celulares.

4.4.2.- ANTICUERPO ANTI-CD163

La valoración de la inmunotinción para anti-CD163 se realizó de forma independiente a la de la población anti-CD68. Morfológicamente se distinguieron tres tipos de células inmunorreactivas para anti-CD163: células redondas, células de hábito dendrítico y células intermedias (con morfología entre célula redonda y de hábito dendrítico) y parecía que existía un gradiente morfológico desde el vaso hasta el centro del tumor (*Fig.50*).

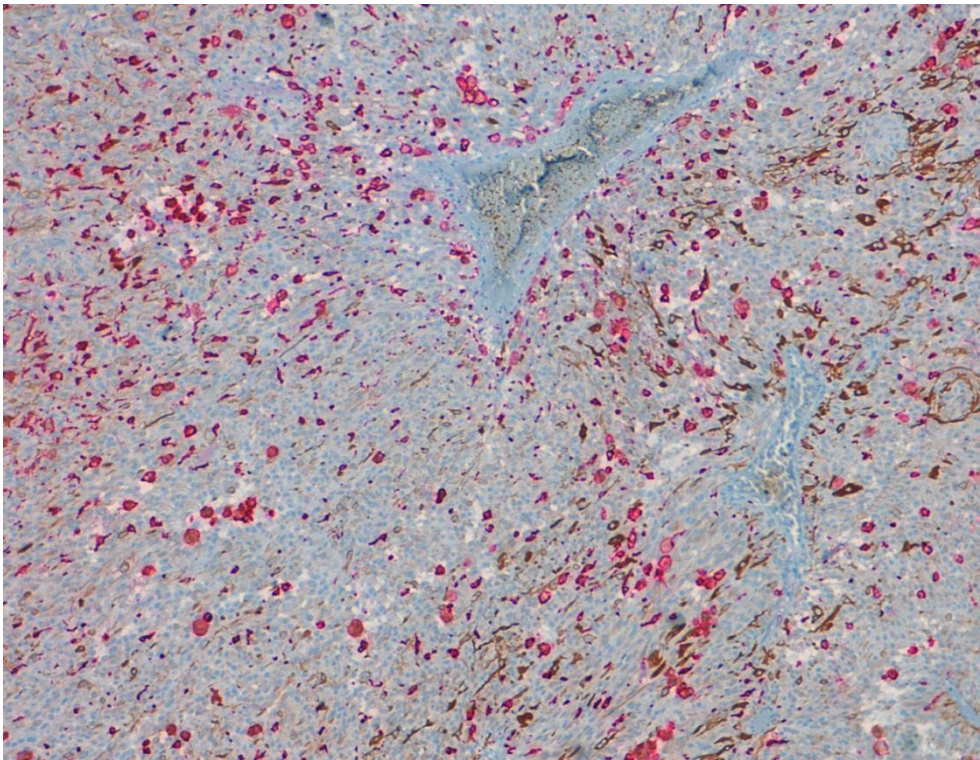


Figura 50. Morfología de las células anti-CD163 positivas (10x.)

Los criterios de evaluación de los resultados inmunohistoquímicos para anti-CD163 fueron los siguientes:

- ❖ Excluir los melanófagos.
- ❖ Graduar el número total de células inmunopositivas para anti-CD163, sabiendo que existían distintas morfologías (redondas, intermedias y de hábito dendrítico), en (Fig.51):
 - (1+): escasas células inmunopositivas para anti-CD163.
 - (2+): numerosas células inmunopositivas para anti-CD163.
 - (3+): muy abundantes células inmunopositivas para anti-CD163.

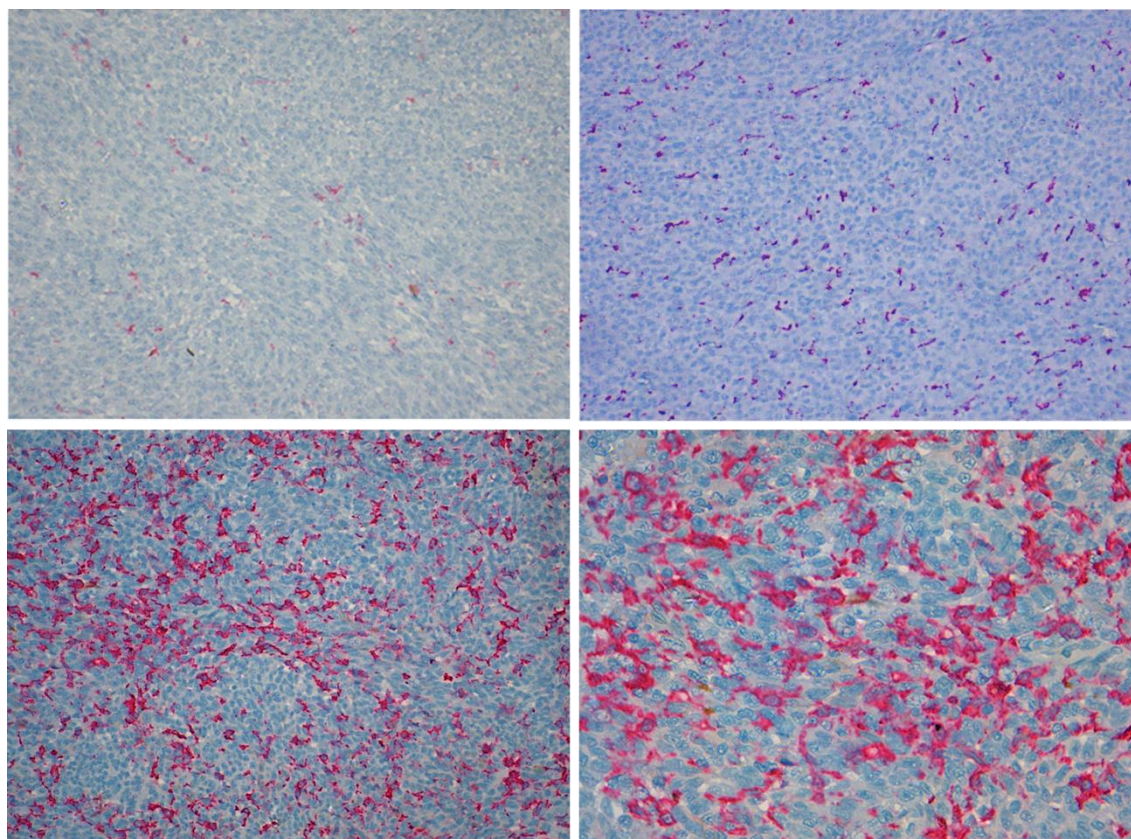


Figura 51. *Immunoexpresion anti-CD163: A) (1+) (20x); B) (2+) (20x) C) (3+) (20x) D) (3+) (40x).*

4.4.3.-ANTICUERPOS ANTI-CD3, ANTI-CD4, ANTI-CD8, ANTI-FOXP3, ANTI-CD20 Y ANTI-CD56

La valoración de la inmunorreacción para anti-CD3 se realizó en tres grupos (*Figura 52*):

- ❖ (0): ausencia de tinción.
- ❖ (1+): escasas células inmunopositivas para anti-CD3.
- ❖ (2+): abundantes células inmunopositivas para anti-CD3.

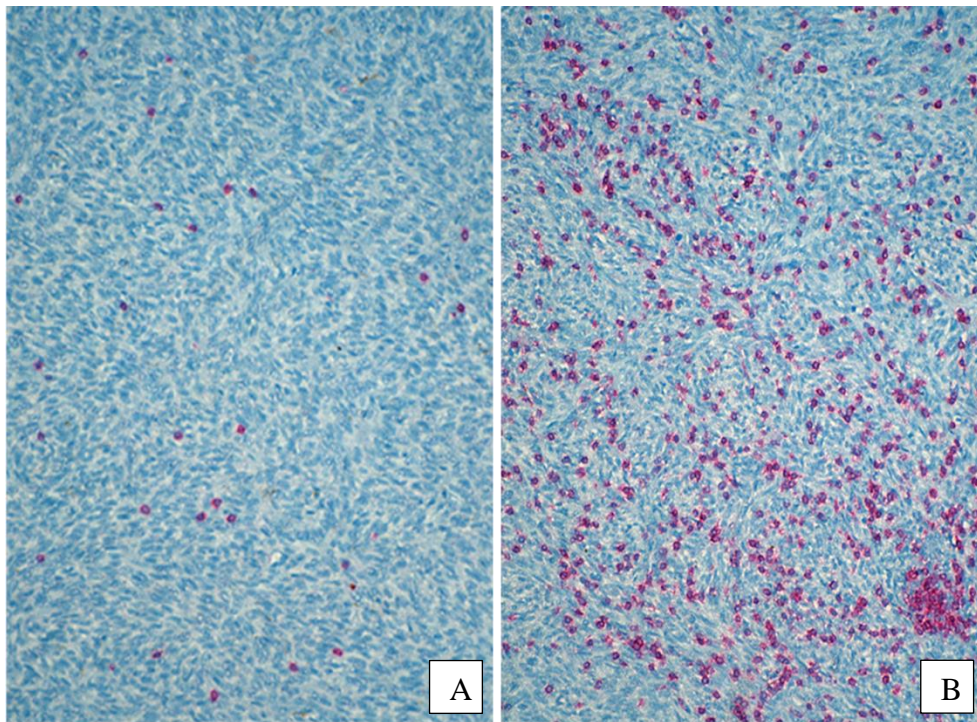


Figura 52. Inmunoexpresión de anti-CD3 (20x): A) (1+); B) (2+).

Seleccionamos los casos con inmunorreacción positiva para anti-CD3 graduado como (2+) y sobre estos casos realizamos la determinación inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, anti-CD20 y anti-CD56.

Para la valoración de la inmunotinción con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 se determinó el cociente CD4/CD8 y se establecieron dos grupos:

- ❖ CD4/CD8 =1 (donde no existía predominio de la expresión entre ambos anticuerpos).
- ❖ CD4/CD8 <1 (donde existía predominio de la expresión de anti-CD8 sobre anti-CD4).

La valoración de la inmunorreacción para anti-Foxp3 se hizo en dos categorías:

- ❖ Negativa: ausencia de tinción.
- ❖ Positiva: presencia de células inmunorreactivas para anti-Foxp3.

La inmunorreacción en el caso del anticuerpo anti-CD56 se valoró de igual manera que el anti-Foxp3, estableciendo, por tanto, las siguientes categorías:

- ❖ Negativa: ausencia de tinción.
- ❖ Positiva: presencia de células inmunorreactivas para anti-CD56.

La reacción inmunohistoquímica para anti-CD20 se valoró en tres grupos:

- ❖ (0): ausencia de tinción.
- ❖ (1+): escasas células inmunopositivas para anti-CD20.
- ❖ (2+): abundantes células inmunopositivas para anti-CD20.

4.4.4.- ANTICUERPO ANTI-KI67

En 43 de los casos estudiados se pudo cuantificar el porcentaje de células inmunopositivas para anti-Ki67 mediante técnicas de recuento automatizado. Se utilizó un microscopio óptico Ventana® equipado con el programa automatizado VIAS. Para ello se contabilizaron 1000 células consecutivas con un objetivo de 20x. En el resto de los casos el pigmento melánico impidió el recuento de células inmunopositivas para este anticuerpo de manera fiable.

En los 43 casos valorados se establecieron dos grupos en base al porcentaje de expresión del anticuerpo anti-Ki67:

- ❖ $< 20\%$
- ❖ $\geq 20\%$

5.- ESTUDIO MOLECULAR

En todos los casos que componen nuestra serie se realizó el estudio molecular mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH). Para ello se seleccionaron,

en la medida de lo posible, aquellos bloques representativos de las distintas áreas tumorales evitándose los que contenían focos de necrosis o hemorragia.

5.1.- PROTOCOLO DE FISH

El protocolo de FISH en tejidos parafinados fue el siguiente:

1. Preparación de las muestras y desparafinación:

- ❖ Montaje de los cortes de tejido parafinado a 3 micras sobre portaobjetos silanizados y permanencia en estufa a 60° durante 24 horas como mínimo.
- ❖ Desparafinado: tras sacar las muestras de la estufa, se sumergen los portaobjetos en una jarra Coplin:
 - Tres pasos de 10 minutos en xilol.
 - Un paso de 5 minutos en xilol.
 - Dos pasos de 2 minutos en etanol al 100%.
 - Dejar secar completamente.

2. Pretratamiento (desenmascaramiento con calor):

- ❖ Poner una jarra Coplin con solución de pretratamiento 1X SSC en un baño a 90°C. Introducir los portaobjetos en dicha solución durante 18 minutos asegurándose antes de su uso que la temperatura dentro de la solución es de 85°C.
- ❖ Lavar 3 minutos en agua destilada.

3. Digestión:

- ❖ Sacar los portaobjetos de la jarra Coplin y secar los bordes y cara inferior.
- ❖ Añadir sobre el portaobjetos 250 µL de la solución de proteinasa K (solución previamente preparada con 1 ml de 2X SSC (sin NP-

40) y 4 μ L de proteinasa K) y poner un cubreobjetos grande (24x50 mm).

- ❖ Introducir en la placa calefactora (Thermobrite Denaturation/Hybridization System, Abbott Molecular) a 37°C durante 20 minutos.
- ❖ Lavar 3 minutos en la jarra Coplin con agua destilada.
- ❖ Deshidratar en batería de etanol: 70%, 85% y 100%, un minuto en cada una.
- ❖ Secar completamente a temperatura ambiente y proceder a la hibridación.

4. Preparación de la sonda:

- ❖ Descongelar y centrifugar unos segundos.

5. Desnaturalización e hibridación:

- ❖ Poner las tiras húmedas en el ThermoBrite.
- ❖ Aplicar 10 μ L de sonda en el área de hibridación.
- ❖ Poner un cubreobjetos de 24x24mm y envolver en parafilm.
- ❖ Poner el portaobjetos en el ThermoBrite, cerrar y ejecutar el programa KIT o PARAFKIT del ThermoBrite (desnaturalización: 74°C durante 3 minutos e hibridación: 37°C durante 16-24 horas).

6. Lavados posthibridación:

- ❖ Tras sacar los portaobjetos del ThermoBrite, se retiran el parafilm sellador y los cubreobjetos.
- ❖ Poner una jarra Coplin con 50 ml de solución de lavado 2X SSC 0,3% NP-40 en baño a 75°C \pm 1°C. Introducir en dicha solución

durante 2 minutos asegurándose antes de su uso que la temperatura dentro de la solución es de $72^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- ❖ Sumergir los porta en una jarra Coplin con 50 ml de solución de lavado 2X SSC 0,1% NP-40 a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- ❖ Dejar secar en posición vertical y en la oscuridad.
- ❖ Aplicar 10 μL de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y un cubreobjetos de 24x50 mm.
- ❖ Envolver con papel de celulosa y papel de plata.
- ❖ Guardar a -20°C .

5.2.- SONDA DNA-ESPECÍFICA

Para la realización del estudio molecular mediante hibridación in situ (FISH), se utilizó la sonda centromérica específica del cromosoma 3 (CEP 3) Spectrum Orange de Vysis (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) para la región 3p11.1-q11-1. De este modo, se estudiaron el total de los 79 casos con el fin de determinar el estatus del cromosoma 3 en núcleos en interfase que se marcan con la sonda específica.

5.3.-VALORACIÓN DE RESULTADOS

Se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia NIKON (modelo Eclipse Ci-S, Nikon Corporation Tokio, Japan) equipado con los filtros correspondientes y empleando un filtro simple DAPI de contratinción para la valoración de los núcleos.

Las señales de hibridación se contabilizaron en 200 núcleos en interfase. Los núcleos solapados se excluyeron del recuento y únicamente se evaluaron los núcleos de las células tumorales. Se consideró delección del cromosoma 3 cuando más del 20% de

los núcleos presentaban una única señal. La valoración de los resultados se ha realizado sin conocimiento de ningún dato del paciente.

6.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se ha efectuado con el programa estadístico SPSS V22.0. Hemos realizado una estadística descriptiva dando las tablas de frecuencias con sus porcentajes (para las variables cualitativas) y las medias con sus desviaciones típicas o estándar (para las variables cuantitativas).

La relación de las variables entre sí se analizó como sigue:

- 1) Si las dos variables eran cualitativas, se usó el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher (en tabla 2x2) calculándose los residuos estandarizados corregidos para determinar de dónde procedía la diferencia.
- 2) Si una variable era cualitativa y la otra cuantitativa, se realizó el test de la t de Student o el análisis de la varianza, con sus correspondientes test de comparaciones múltiples (test de Bonferroni).
- 3) En el caso de que la variable dependiente fuera el tiempo hasta la recidiva, metástasis o muerte, hemos realizado análisis de la supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier, dando las estimaciones de la supervivencia media con su correspondiente intervalo de confianza al 95%, el test de Log-Rank para compararlas y finalmente el gráfico de la supervivencia.

Se consideró significativo cuando se obtuvo un nivel de significación $< 0,05$.

RESULTADOS

1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1.1.-SEXO

Se estudiaron 79 pacientes afectados de melanoma uveal diagnosticados en nuestro Servicio, siendo 41 hombres (51,9%) y 38 mujeres (48,1%).

1.2.-EDAD

El intervalo de edad se encontraba entre los 14 y los 84 años, con una edad media de 58,5 años. La mayor incidencia correspondía a la 6ª-7ª década de la vida (*Fig. 53*).

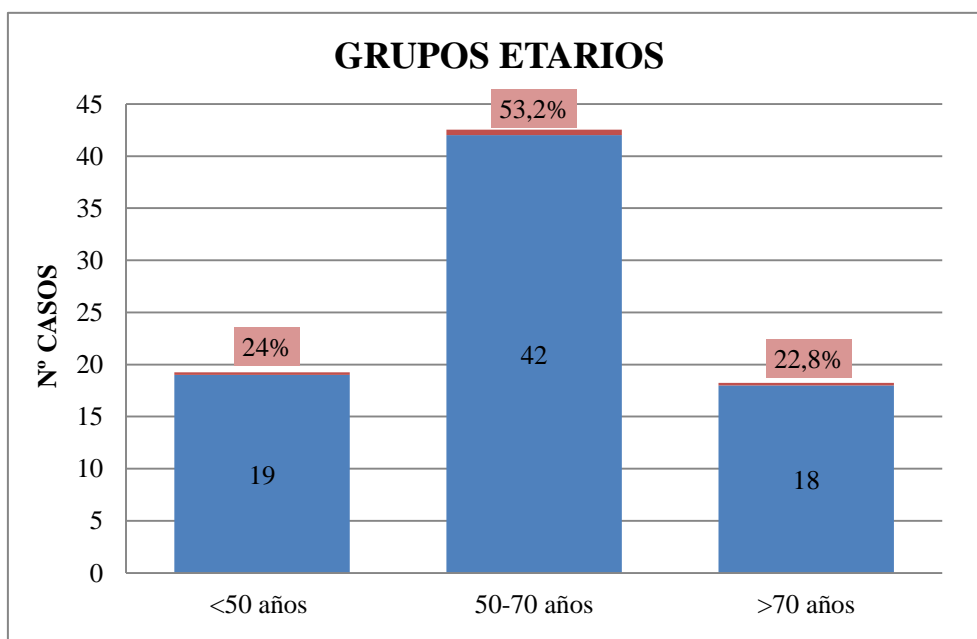


Figura 53. Clasificación de los casos por grupos etarios.

1.3.- LATERALIDAD

El tumor se localizaba en el ojo izquierdo en 43 casos (54,4%) y en el ojo derecho en 36 casos (45,6%).

1.4.- LOCALIZACIÓN

Los melanomas de coroides (87,3%) predominaron sobre aquellos localizados en el cuerpo ciliar (11,4%) y en el iris (1,3%) (*Fig. 54-57*).

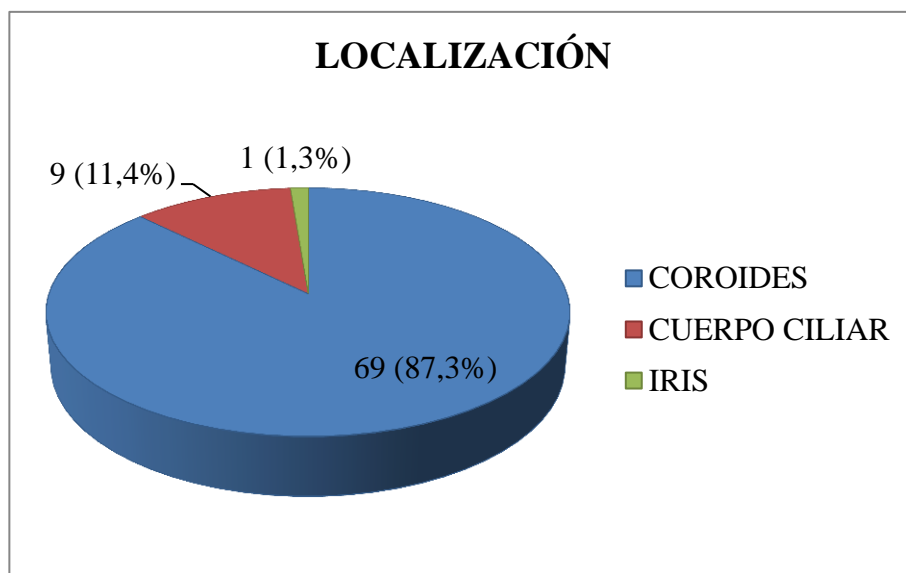


Figura 54. Distribución de los casos según la localización en el tracto uveal.

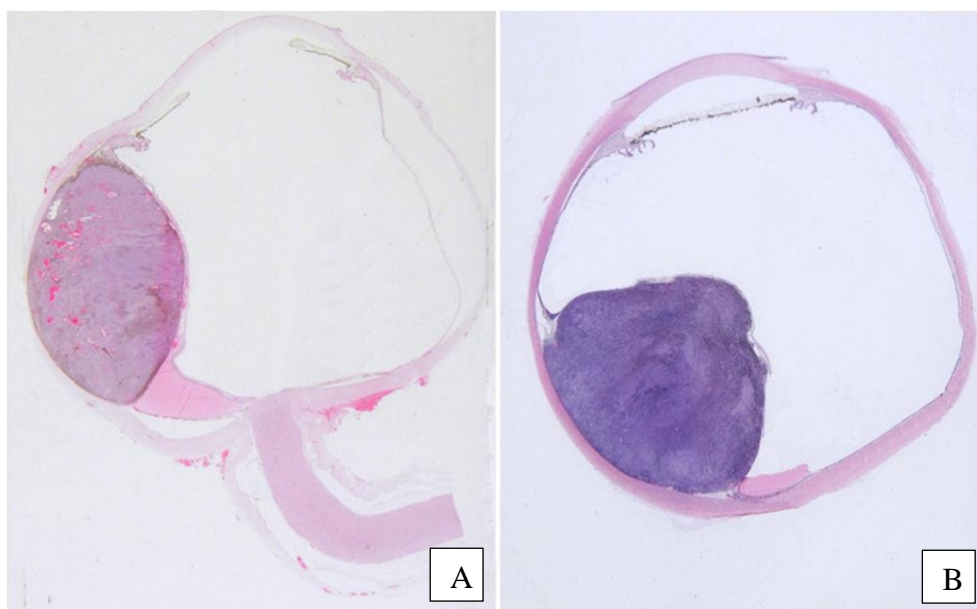


Figura 55. Melanomas de coroides.



Figura 56. Melanomas de cuerpo ciliar: A) visión panorámica; B) HE, 2x.

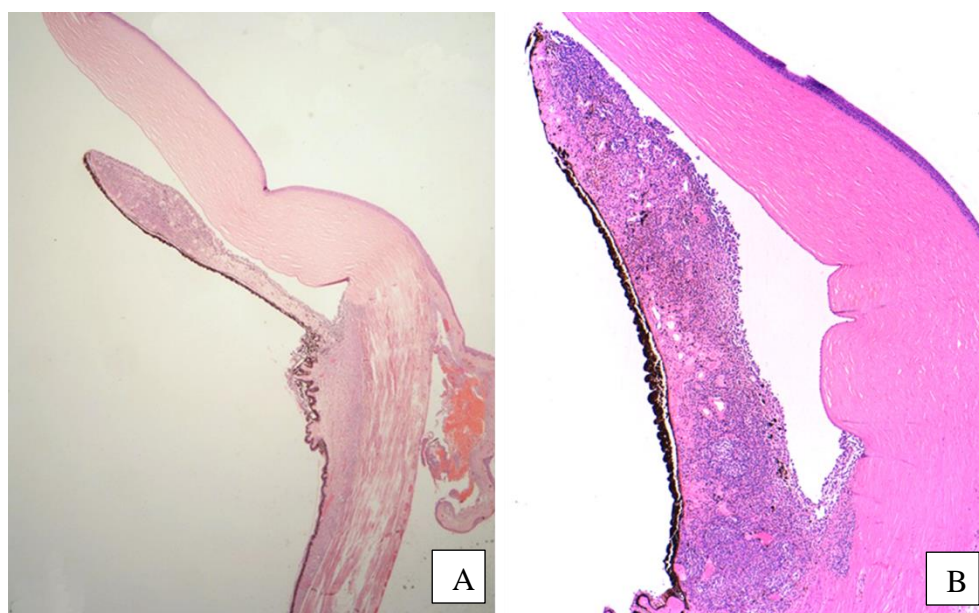


Figura 57. Melanomas de iris: A) HE, 2x; B) HE, 4x.

1.5.- TAMAÑO DEL TUMOR

Basándonos en los criterios establecidos por el Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS),⁹⁴ para clasificar a los melanomas de coroides y cuerpo ciliar atendiendo al tamaño tumoral, se observó que los tumores grandes eran los más frecuentes de la muestra, 39 (50,0%) seguidos por los medianos, 38 (48,1%). Sólo uno de los tumores fue clasificado como pequeño (1,3%).

1.6.- CATEGORÍA TUMORAL

De los 79 pacientes con melanoma uveal, 10 (12,7%) fueron clasificados como categoría T1, 14 (17,7%) como categoría T2, 34 (43,0%) como categoría T3 y 21 (26,6%) como categoría T4 (Fig. 58).

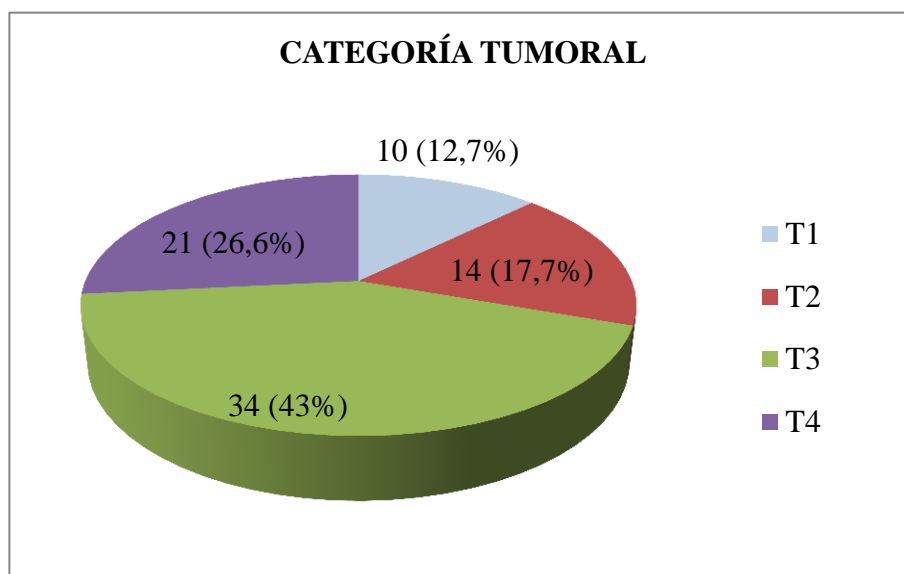


Figura 58. Clasificación de los casos según su categoría tumoral.

1.7.- ESTADIO SEGÚN EL SISTEMA TNM

El estadio quedó establecido en I para 7 pacientes (8,9%), en IIA para 6 (7,6%), en IIB para 20 (25,3%), en IIIA para 10 (12,7%), IIIB para 4 (5,1%), IIIC para 2 (2,5%) y estadio IV para 29 pacientes (36,7%). En un paciente (1,3%) no se pudo determinar este dato (*Tabla 18*).

ESTADIO	Nº DE CASOS	PORCENTAJE (%)
I	7	8,9
IIA	6	7,6
IIB	20	25,3
IIIA	10	12,6
IIIB	4	5,1
IIIC	2	2,5
IV	29	36,7
PERDIDOS DEL SISTEMA	1	1,3
TOTAL	79	100,0

Tabla 18. Clasificación de los casos según su estadio.

1.8.- EVOLUCIÓN CLÍNICA

Tras un tiempo de seguimiento medio de 50,1 meses (oscilando entre 3 y 115 meses), 30 pacientes (38%) desarrollaron metástasis mientras que 49 pacientes (62%) finalizaron el estudio libre de enfermedad metastásica. El intervalo de meses en aparecer metástasis osciló entre los 3 y los 96 meses. De los 30 casos con metástasis, en 26 pacientes (86,7%) las metástasis se produjeron en el hígado y en 13 pacientes (43,3%) las localizaciones de las metástasis fueron muy diversas (*Tabla 19*).

LOCALIZACIÓN METÁSTASIS	Nº DE CASOS	PORCENTAJE (%)
Hígado	26	86,7
Pulmón	11	36,7
Hueso	5	16,7
Suprarrenal	2	6,7
Páncreas	2	6,7
Ganglio linfático	3	10
Pleura	2	6,7
Riñón	1	3,3
Mama	1	3,3
Cerebro	2	6,7
Duodeno	2	6,7
Peritoneo	2	6,7
Cuero cabelludo	1	3,3
Bazo	1	3,3
Cuádriceps	1	3,3
Mediastino	1	3,3

Tabla 19. Localización de las metástasis.

RESULTADOS

Dos pacientes (2,5%) presentaron recidiva tumoral después de la enucleación, a los 17 y 36 meses respectivamente. Tras finalizar el seguimiento, 58 pacientes (73,4%) estaban vivos, 9 de ellos (15,5%) presentaban metástasis y 21 pacientes (26,6%) habían fallecido por melanoma en un período comprendido entre los 3 y 91 meses después de la intervención quirúrgica.

El tiempo libre de enfermedad (expresado en meses) se calculó hallando la diferencia entre la fecha de inicio de seguimiento (fecha de intervención quirúrgica) y la fecha del primer evento positivo detectado en la historia clínica (recidiva o metástasis). En caso de no existir recidiva ni metástasis, este intervalo coincidió con el tiempo de seguimiento. El análisis del tiempo libre de enfermedad proporcionó un valor de 76,3 meses de media con un intervalo de confianza del 95% (66-87) (*Fig.59*).

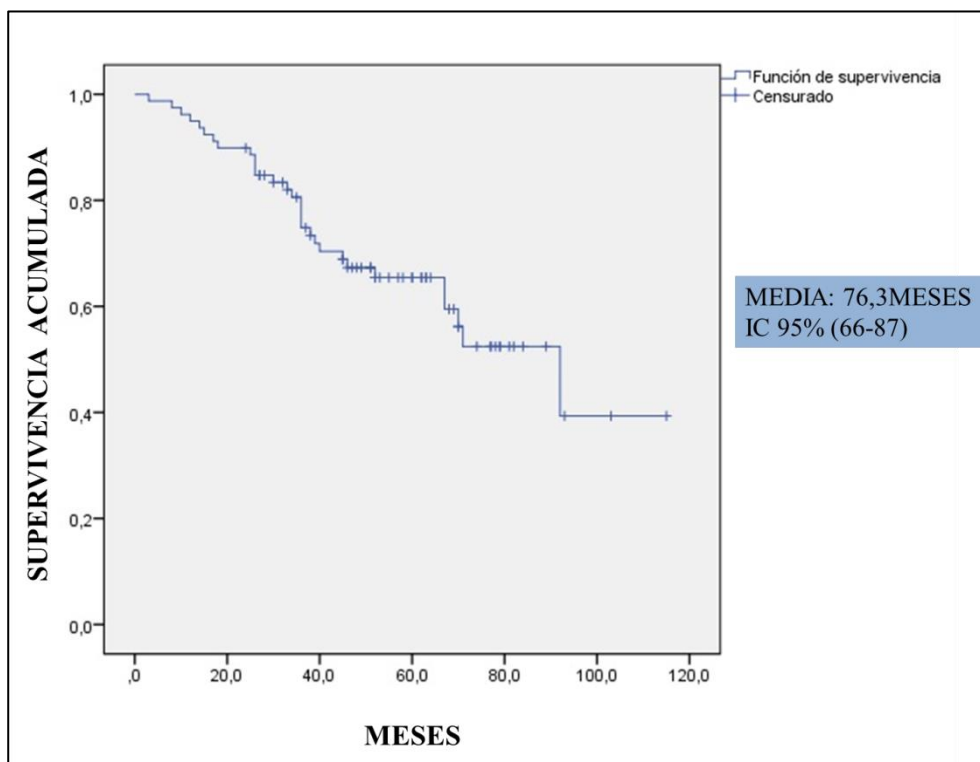
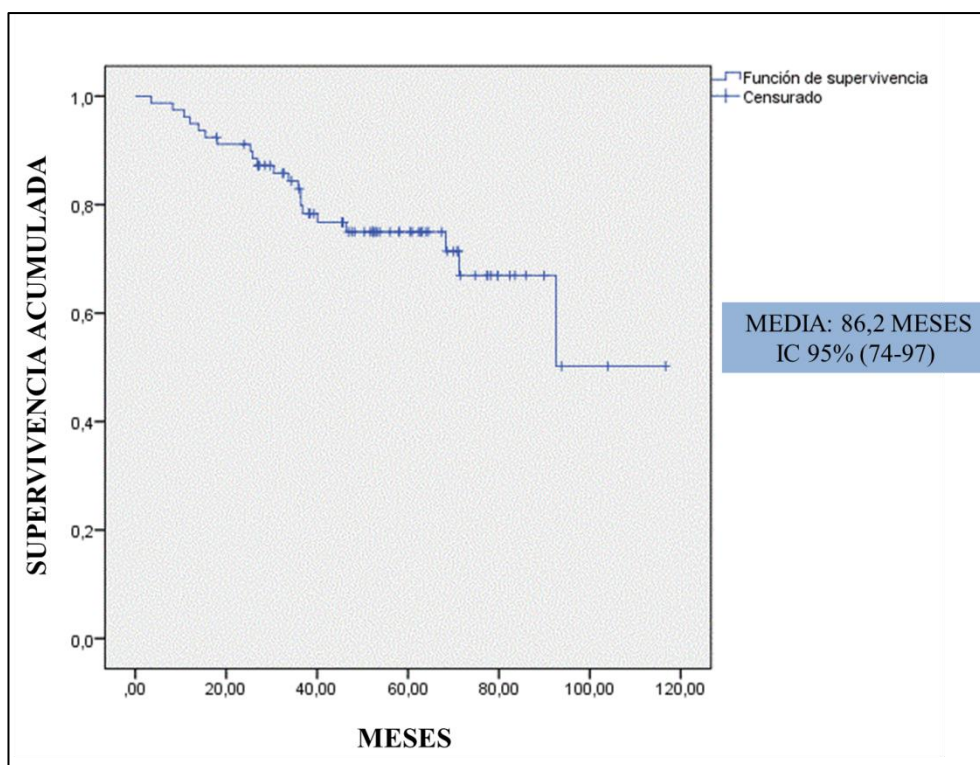


Figura 59. Tiempo libre de enfermedad (hasta aparición de recidiva o metástasis).

La supervivencia global (expresada en meses) se calculó asimismo a partir de la fecha de inicio de seguimiento (fecha de intervención quirúrgica) y la fecha de éxitus o la fecha de la última revisión. Los resultados del estudio aportaron el dato de una supervivencia global media de 86,2 meses con un intervalo de confianza del 95% (74-97) (Fig. 60).



2.- RASGOS HISTOPATOLÓGICOS

2.1.- TIPO HISTOLÓGICO

Los 79 casos de este estudio fueron clasificados en los siguientes tipos histológicos (Fig. 61):

- ❖ Melanoma de células fusiformes (aquellos con más del 90% de células fusiformes, con un patrón cito-histológico fasciculado (haces gruesos, entrelazados), cohesivo, sincitial, citoplasma escaso aunque puede ser

relativamente abundante, límite impreciso, núcleo alargado (morfología fusiforme), presencia de hendidura longitudinal o nucléolo): 28 casos (35,4%).

- ❖ Melanoma de células epitelioides (aquellos con más del 90% de células epitelioides, patrón no fasciculado, pérdida de cohesión o patrón falsamente cohesivo, células de forma redonda o poliédrica, citoplasma abundante y eosinófilo, límite celular preciso, membrana celular patente, núcleo redondo, central y grande, nucléolo central, eosinófilo y prominente) : 6 casos (7,6%).
- ❖ Melanoma de células intermedias (aquellos que no presentan un patrón claro ni de células fusiformes ni de células epitelioides, células fusiformes a las que les falta cohesión, con menos disposición sincitial (células individualizables), células poliédricas más cohesivas, no presentan hendiduras, nucléolos ocasionales, pleomorfismo con variabilidad en el tamaño, células gigantes, multinucleadas, irregularidad nuclear y citoplásmica): 35 casos (44,3%).
- ❖ Melanoma de tipo mixto (aquellos con menos del 90% de células fusiformes y más del 10% de células epitelioides, presentando buena delimitación entre ambos componentes): 10 casos (12,7%).

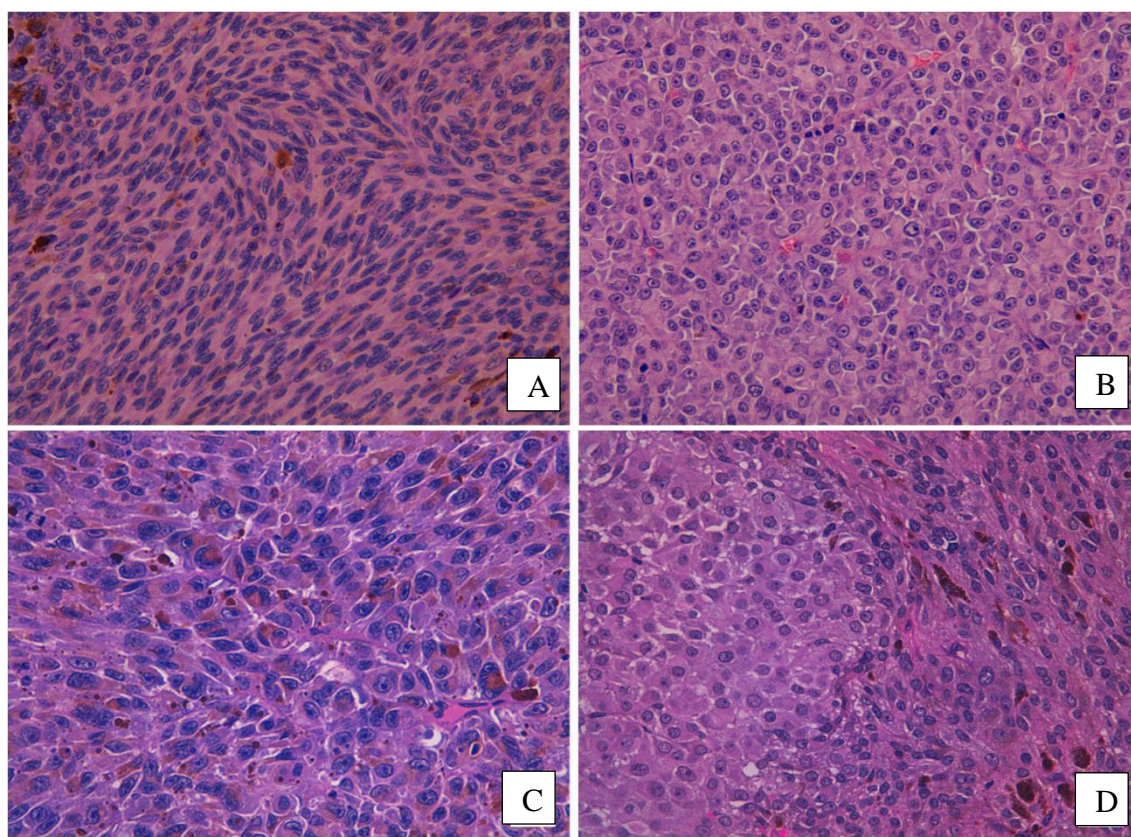


Figura 61. Tipos histopatológicos (HE, 40x): A) melanoma de células fusiformes; B) melanoma de células epitelioides; C) melanoma de células intermedias; D) melanoma de tipo mixto.

2.2.-PATRÓN DE CRECIMIENTO

Atendiendo a los patrones de crecimiento según los criterios que se han establecido en material y métodos (pág. 116), el patrón más frecuente fue el focal (71 casos, 89,9%), seguidos por igual por el patrón de crecimiento difuso plano (4 casos, 5,1%) y difuso en anillo (4 casos, 5,1%) (Fig.62-65).

2.3.- GRADO DE PIGMENTACIÓN

Se valoró la pigmentación global, es decir, incluyendo el pigmento de las células tumorales y de los macrófagos. Tres casos (3,8%) no mostraron pigmentación, en 31 casos (39,2%) el grado de pigmentación era escaso y en 45 casos (57,0%) abundante (Fig. 35). En general, los melanomas uveales son neoplasias con mucho pigmento

melánico y esta circunstancia debe tenerse en cuenta a la hora de plantear cualquier estudio inmunohistoquímico.

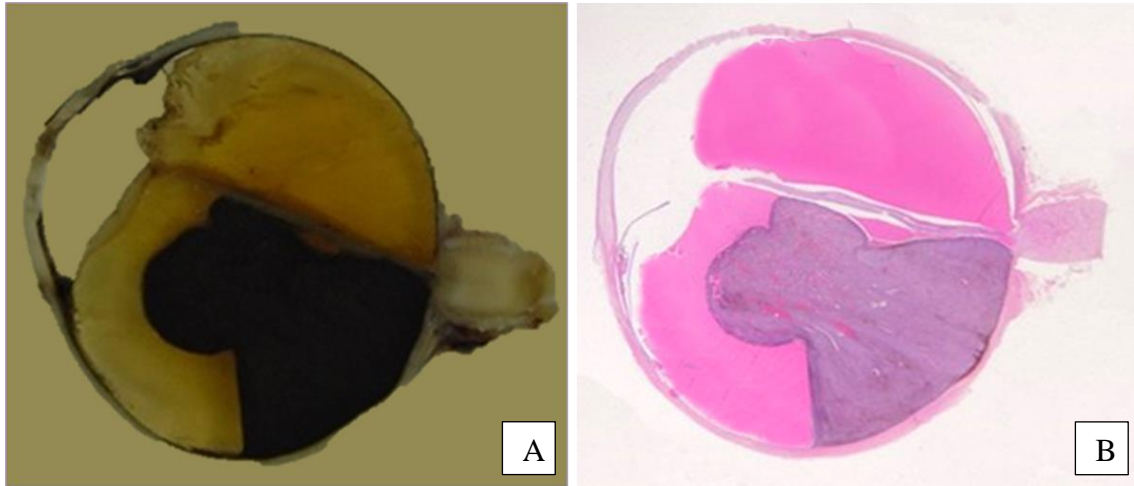


Figura 62. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento focal.

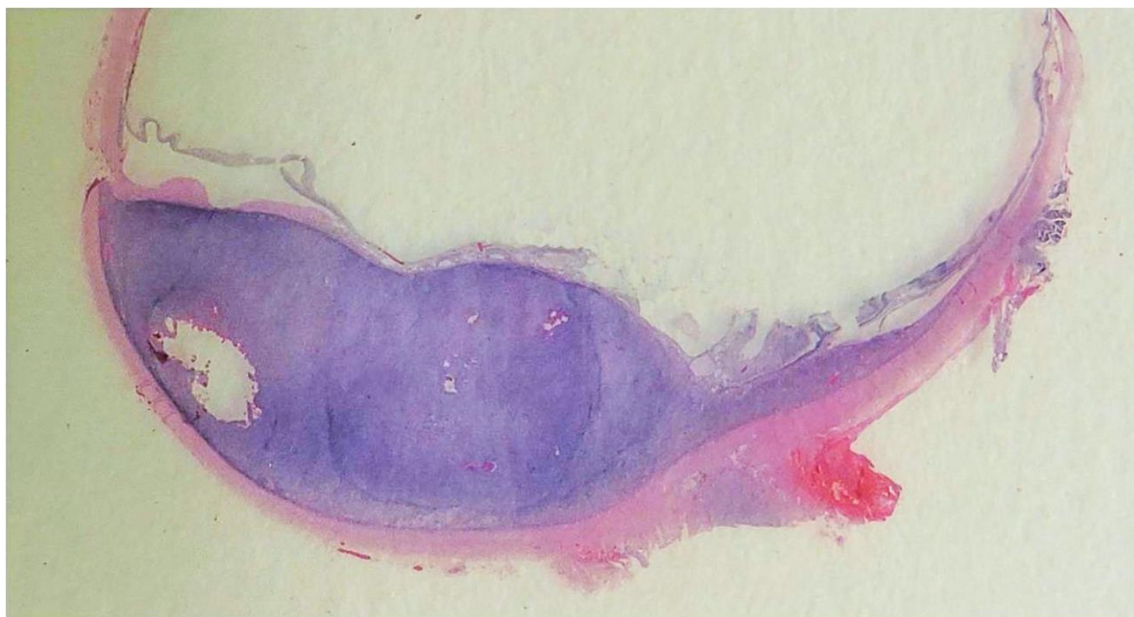


Figura 63. Melanoma de coroides con patrón de crecimiento difuso plano.

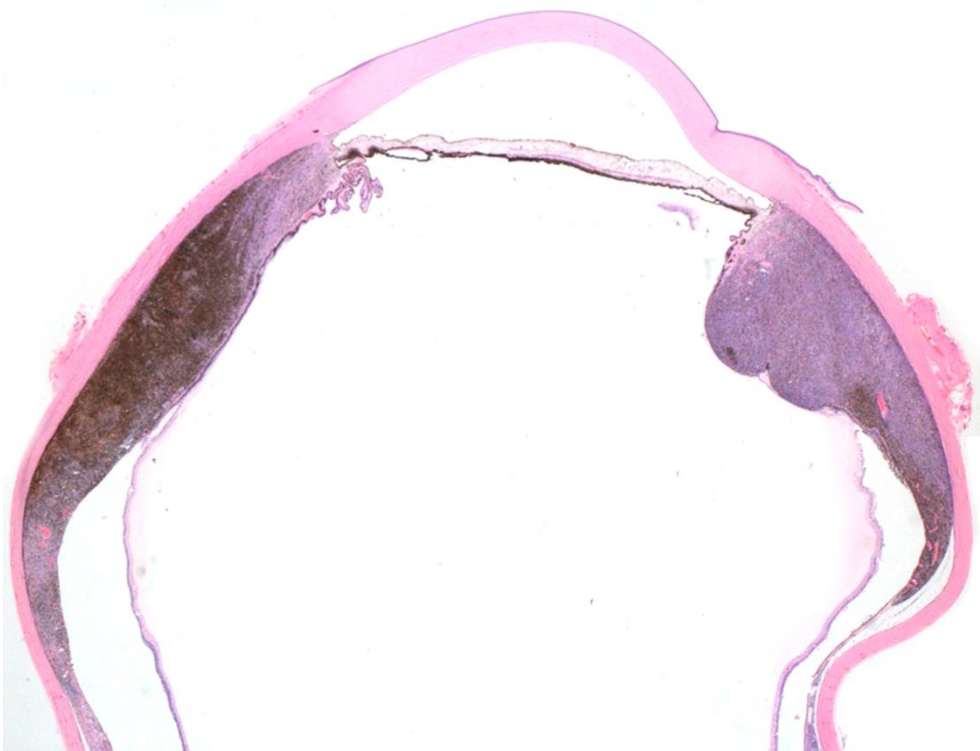


Figura 64. Melanoma de cuerpo ciliar con patrón de crecimiento difuso en anillo.

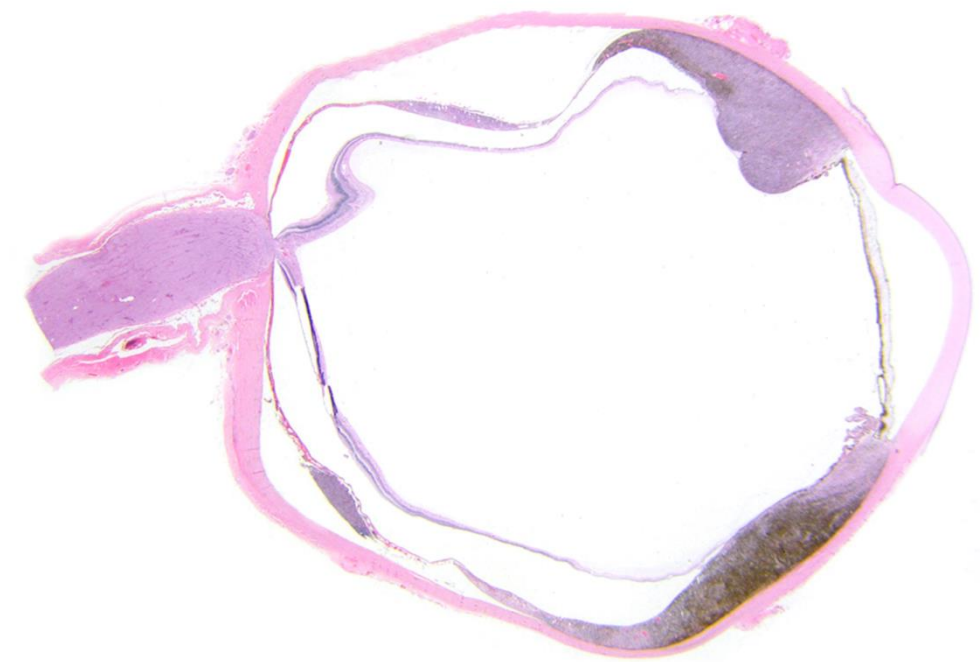


Figura 65. Melanoma de cuerpo ciliar con patrón de crecimiento difuso en anillo.

2.4.- NECROSIS

En 54 casos (68,4%) no había necrosis tumoral significativa, en 22 casos (27,8%) la necrosis era $\leq 50\%$ del tumor y en 2 casos (3,8%) $>$ del 50% (*Fig 66*).

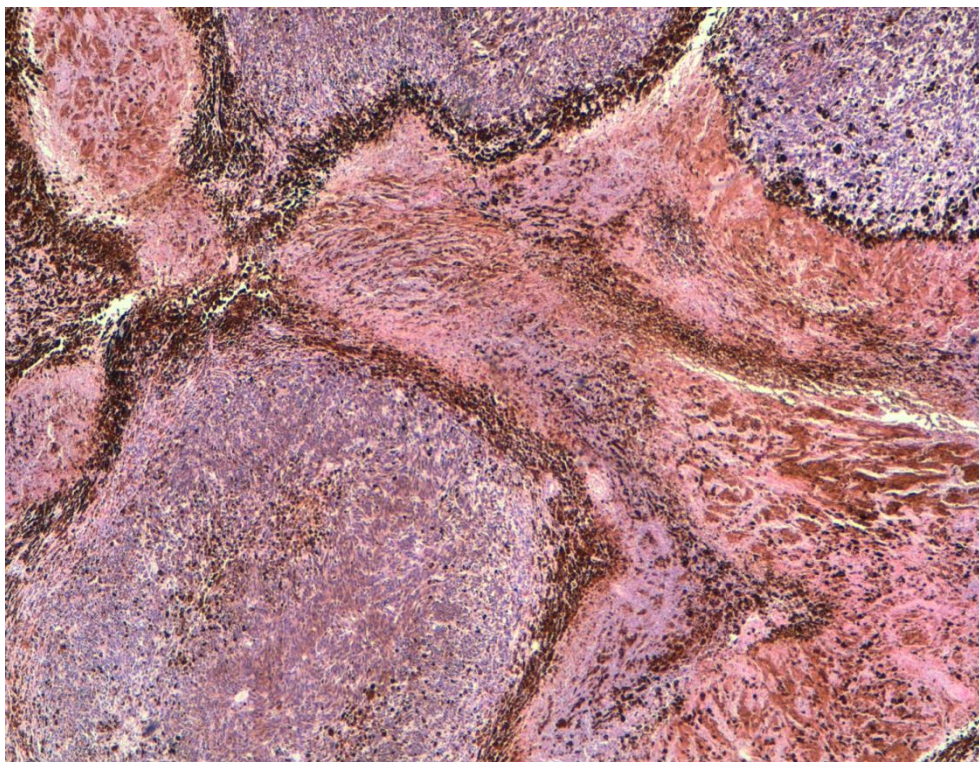


Figura 66. Melanoma con áreas de necrosis (HE, 4x).

2.5.- ÍNDICE DE MITOSIS

El número de mitosis/40 CGA oscilaba entre 0 y 64 mitosis/40 CGA con una media de 9,6 mitosis/40 CGA y una desviación estándar de 12,4 (*Fig. 67*).

2.6.- AFECTACIÓN DEL CUERPO CILIAR

De los 79 casos estudiados, 52 (65,8%) no mostraron afectación del cuerpo ciliar mientras que la presencia de afectación del cuerpo ciliar se observó en 26 (32,9%) (*Fig. 68*). En un caso (1,3%) no se pudo determinar este dato. El 53% de los pacientes con afectación del cuerpo ciliar presentaron metástasis y el 42% fallecieron.

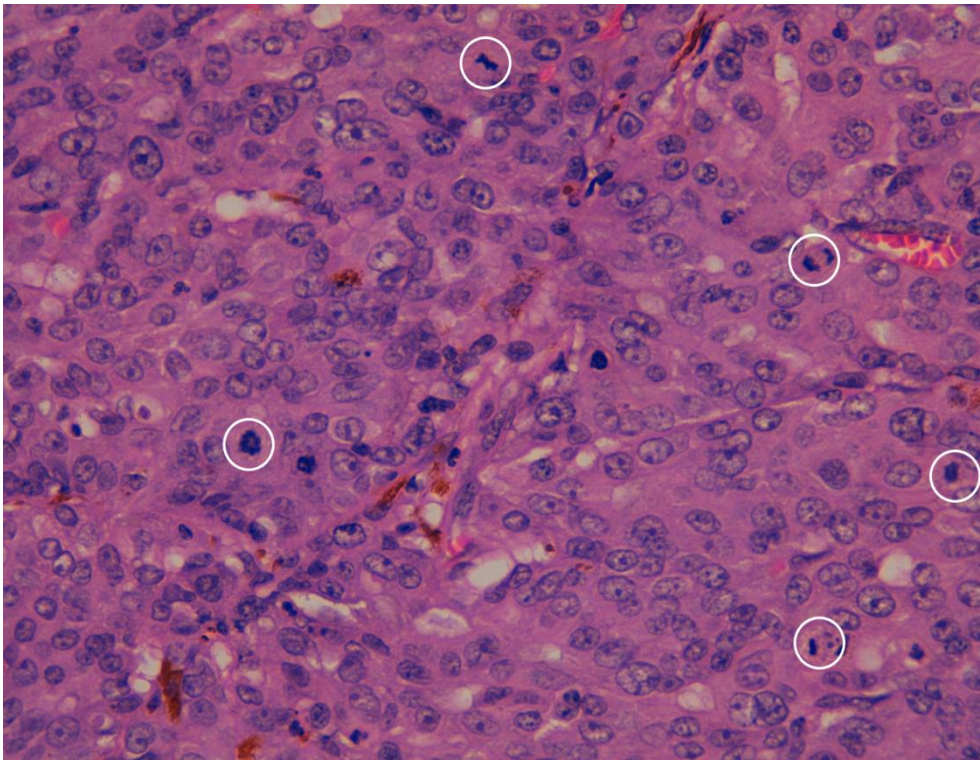


Figura 67. Melanoma de coroides con elevado índice de mitosis (HE, 40x).

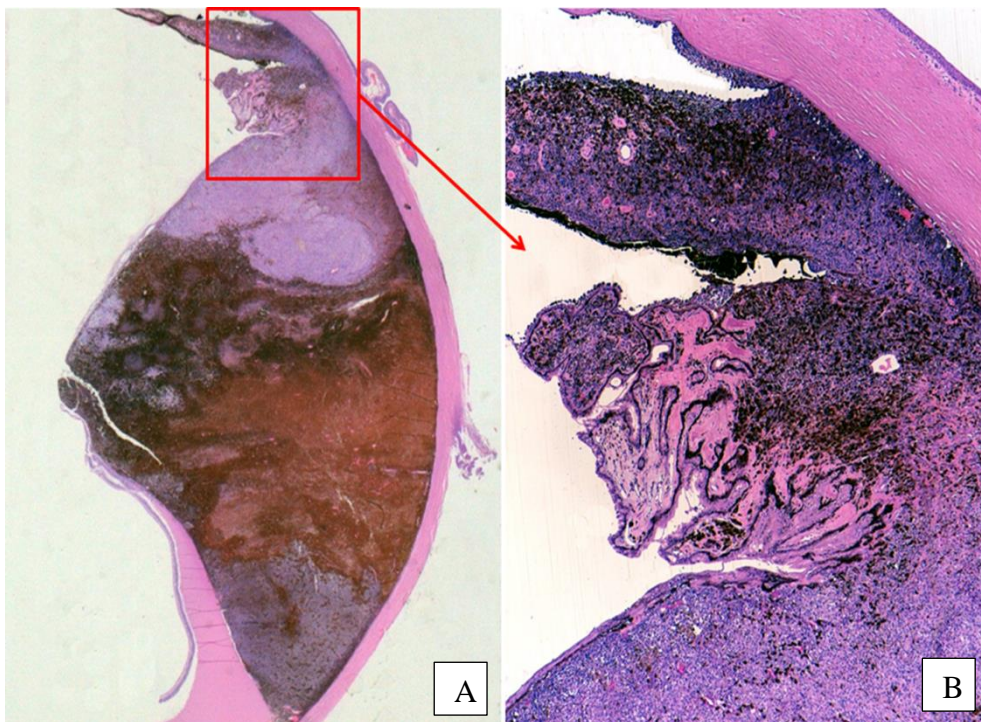


Figura 68. Melanoma de coroides con afectación del cuerpo ciliar: A) visión panorámica; B) detalle de la afectación (HE, 40x).

2.7.- AFECTACIÓN ESCLERAL

En 38 casos (48,1%) existía infiltración de la esclera (*Fig. 69*) y en 11 casos (13,9%) el melanoma infiltraba y rebasaba la esclera (*Fig. 70*). En 30 casos (38,0%) no se constató afectación escleral.

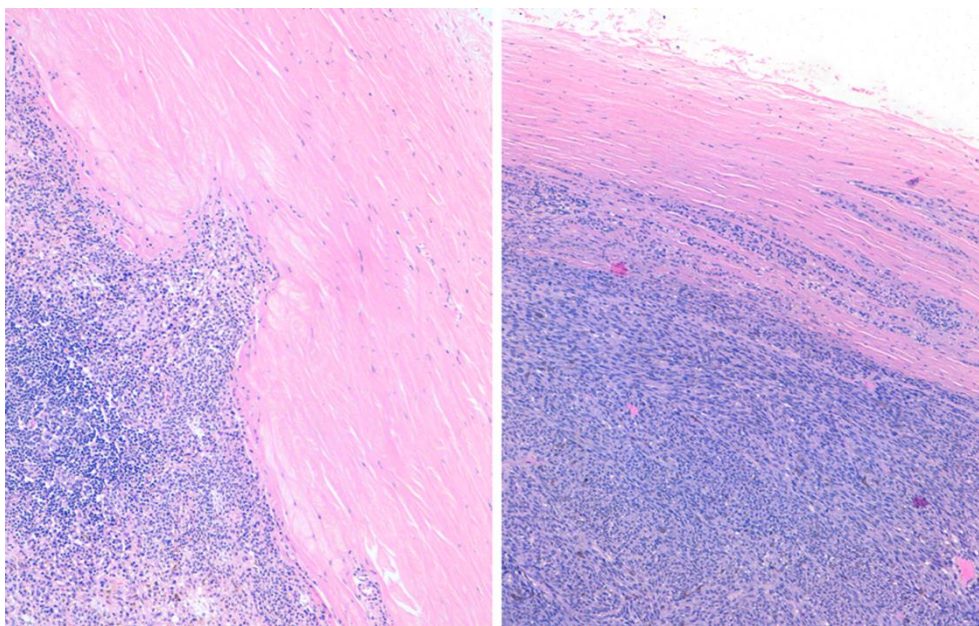


Figura 69. Melanomas de coroides con afectación intraescleral (HE, 10x).

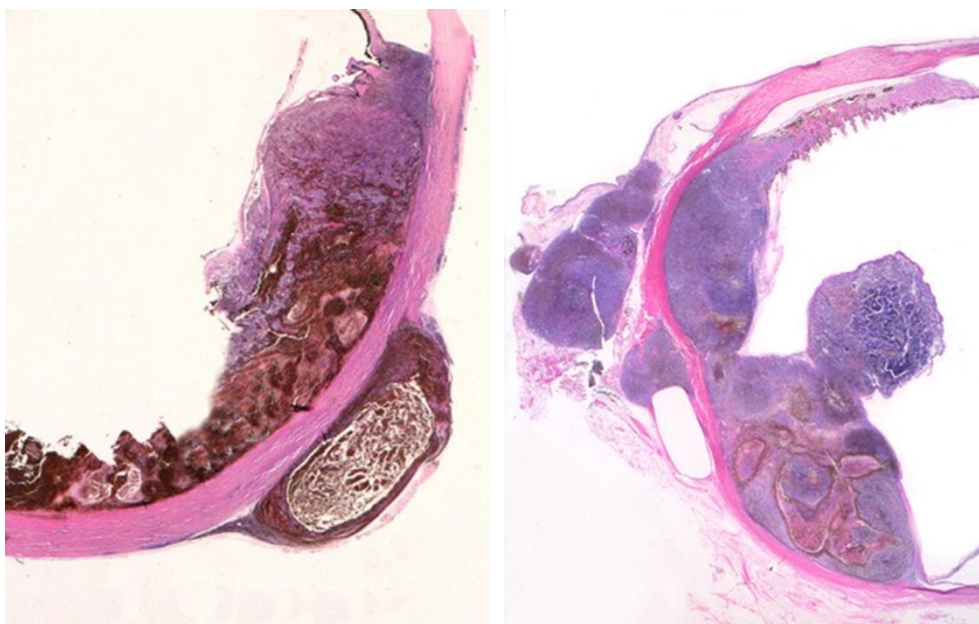


Figura 70. Melanomas de coroides con extensión extraescleral (HE).

2.8.- INVASIÓN VASCULAR

Únicamente se observó invasión vascular en las venas vorticosas en dos casos (2,5%), no constatándose en los 77 restantes (97,5%) (*Fig.71-72*).

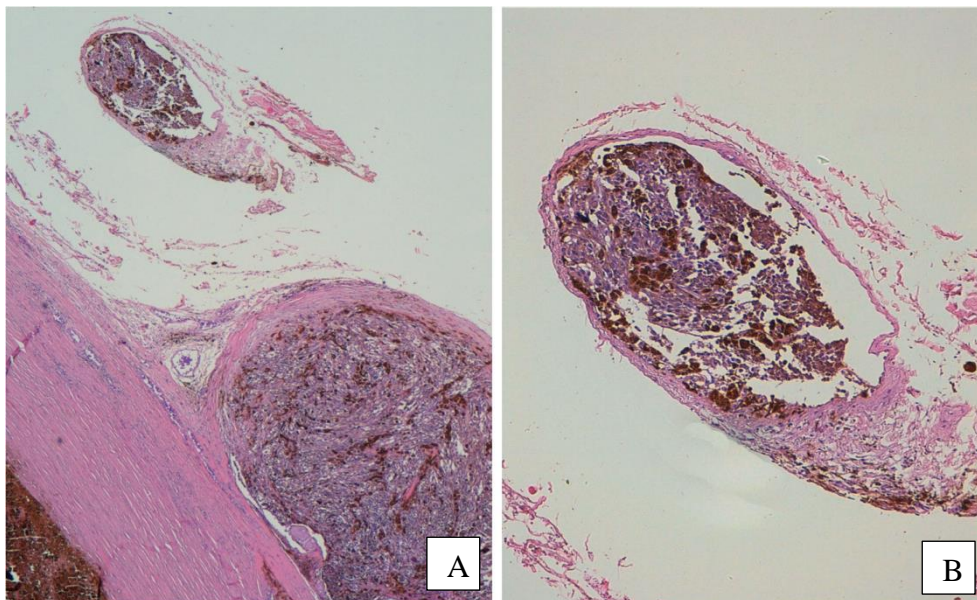


Figura 71. A) Melanoma de coroides con invasión vascular y nódulo extraescleral (HE, 4x); B) invasión vascular (HE, 10x).

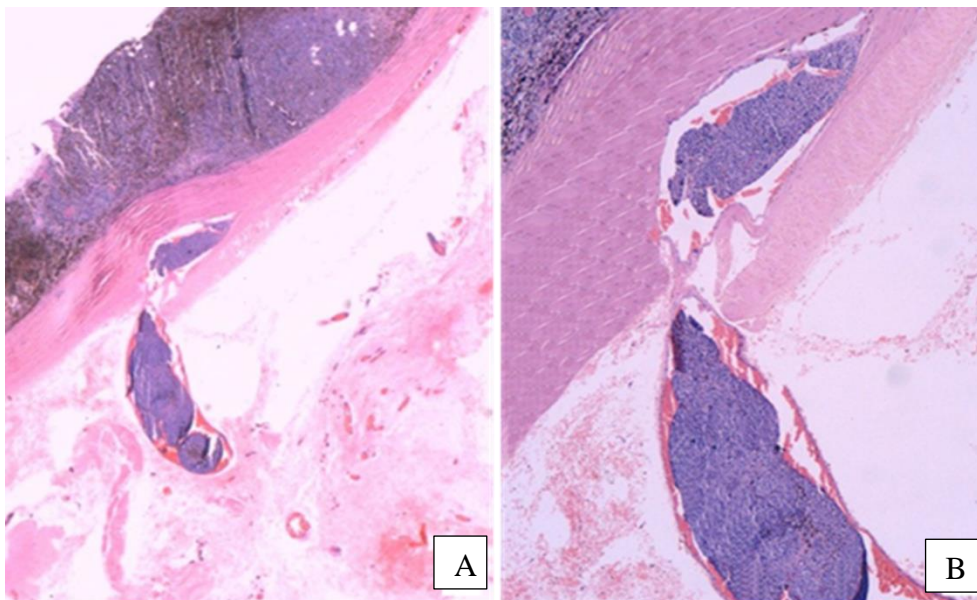


Figura 71. Melanoma de coroides con invasión vascular en su porción intraescleral y extraescleral: A) visión panorámica; B) HE, 4x.

2.9.- INVASIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

En 72 casos (91,1%) no se encontró invasión del nervio óptico, mientras que en seis casos (7,6%) existía invasión prelaminar (*Fig. 72*) y en un sólo caso (1,3%) la invasión fue postlaminar (*Fig.73*).

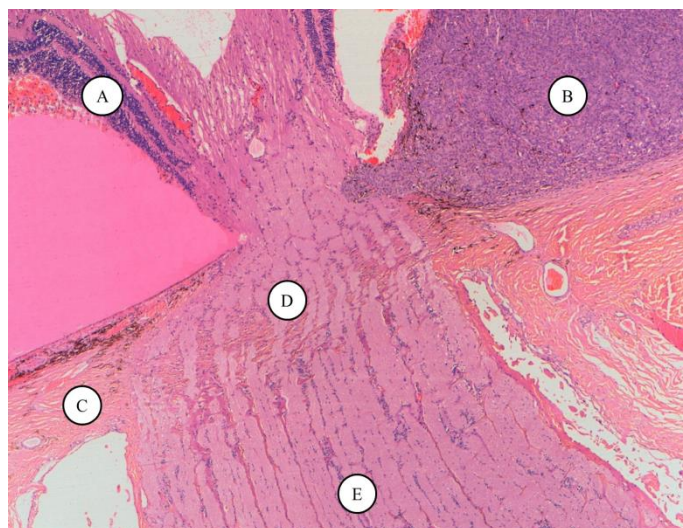


Figura 72. Melanoma de coroides con invasión prelaminar del nervio óptico (HE, 4x).

A) retina; B) melanoma; C) esclera; D) lámina cribrosa; E) nervio óptico.

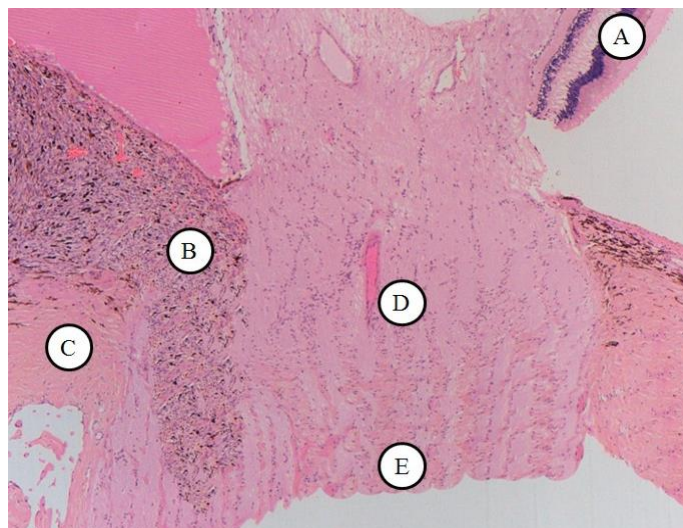


Figura 73. Melanoma de coroides con invasión postlaminar del nervio óptico (HE, 4x).

A) retina; B) melanoma; C) esclera; D) lámina cribrosa; E) nervio óptico.

3.- RELACIÓN ENTRE EL TIPO HISTOLÓGICO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-MORFOLÓGICAS

3.1.- MELANOMA DE CÉLULAS FUSIFORMES

La mayoría de los melanomas de células fusiformes presentaron abundante grado de pigmentación y el 75% de los mismos no mostraron necrosis. Este tipo histológico se asoció con la ausencia de afectación del cuerpo ciliar ($p=0,021$) y la mayor parte (96,4%) de los casos presentó un patrón de crecimiento focal. En ninguno de los casos se constató invasión vascular y la mayoría (96,4%) no presentaron invasión del nervio óptico. Por lo general, no sobrepasaron, la esclera (sólo el 7,1% de este tipo histológico la rebasó).

Este tipo histológico fue el que menos metastatizó, sólo el 17,9% de los melanomas de células fusiformes metastatizaron ($p=0,059$) y produjo menor número de éxitus (10,7%) ($p=0.084$). Ninguno de los casos correspondiente a este tipo de melanoma presentó recidiva tumoral.

3.2.- MELANOMA DE CÉLULAS EPITELIOIDES

El 50% de los melanomas de células epitelioides se categorizaron como T1 y se asoció con mayor frecuencia con un tamaño pequeño aunque sin ser estadísticamente significativo. Todos los casos de este tipo histológico se localizaron en la coroides y presentaron menor grado de pigmentación (el 66,7% de los melanomas epitelioides mostraron escasa o ninguna pigmentación). En este tipo de melanoma no se observó necrosis, invasión vascular ni un patrón de crecimiento difuso (plano o en anillo). Sólo el 16,7% presentó afectación del cuerpo ciliar. El melanoma de células epitelioides se asoció con mayor frecuencia con la invasión postlaminar del nervio óptico aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

El 50% de los melanomas de células epitelioides metastatizaron y el 50% de los pacientes con este tipo histológico fallecieron. De los 2 casos que recidivaron uno fue de células epitelioides.

3.3.- MELANOMA DE CELULAS INTERMEDIAS

La mayoría (68,6%) de los melanomas de células intermedias mostraron abundante grado de pigmentación. La mayor parte (66,7%) de los melanomas que presentaron amplias áreas de necrosis (>50%) así como el 59,1% de los que mostraron ≤50% de necrosis fueron de este tipo.

El 44,4% de los melanomas localizados en el cuerpo ciliar correspondieron a melanomas de células intermedias. La mayor parte (75%) de los melanomas con patrón de crecimiento difuso en anillo correspondieron a este tipo histológico. El melanoma de células intermedias presentó con mayor frecuencia afectación intraescleral y rebasó la esclera (el 47,4% de los melanomas con afectación intraescleral y el 63,6% de los que rebasaron la esclera fueron melanomas de células intermedias). En cuanto a la invasión del nervio óptico, el 50% de los melanomas que presentaron invasión prelaminar fueron melanomas correspondientes a este tipo.

El 48,6% de los melanomas de células intermedias metastatizaron y el 31,4% de los pacientes con este tipo histológico fallecieron. Uno de los dos casos que mostraron recidiva así como invasión vascular pertenecía a este tipo histológico.

El índice de mitosis se relacionó con los tipos histológicos globalmente y la diferencia fundamental apareció entre los melanomas de células fusiformes y los melanomas de células intermedias. Los melanomas de células intermedias presentaron mayor número de mitosis/40 CGA ($p=0,026$) que los melanomas de células fusiformes.

3.4.- MELANOMA DE TIPO MIXTO

En cuanto al grado de pigmentación el 50% de los melanomas de tipo mixto presentaron escaso pigmento y el otro 50% abundante. Se asoció con mayor frecuencia con la localización en el cuerpo ciliar y con un patrón de crecimiento difuso plano

aunque sin ser estadísticamente significativo. El melanoma de tipo mixto se asoció con la afectación del cuerpo ciliar ($p=0,021$), el 70% de los melanomas de este tipo histológico presentaron afectación del cuerpo ciliar. Uno de los dos casos de melanoma en los que se observó invasión vascular fue de este tipo. La mayor parte (90%) no mostró invasión del nervio óptico mientras que la mayoría (70%) presentó afectación intraescleral.

El 50% de los melanomas de tipo mixto (al igual que los de células epitelioides metastatizaron) y el 40% de los pacientes con este tipo histológico fallecieron. Ninguno de los casos recidivó (*Fig. 74-75*).

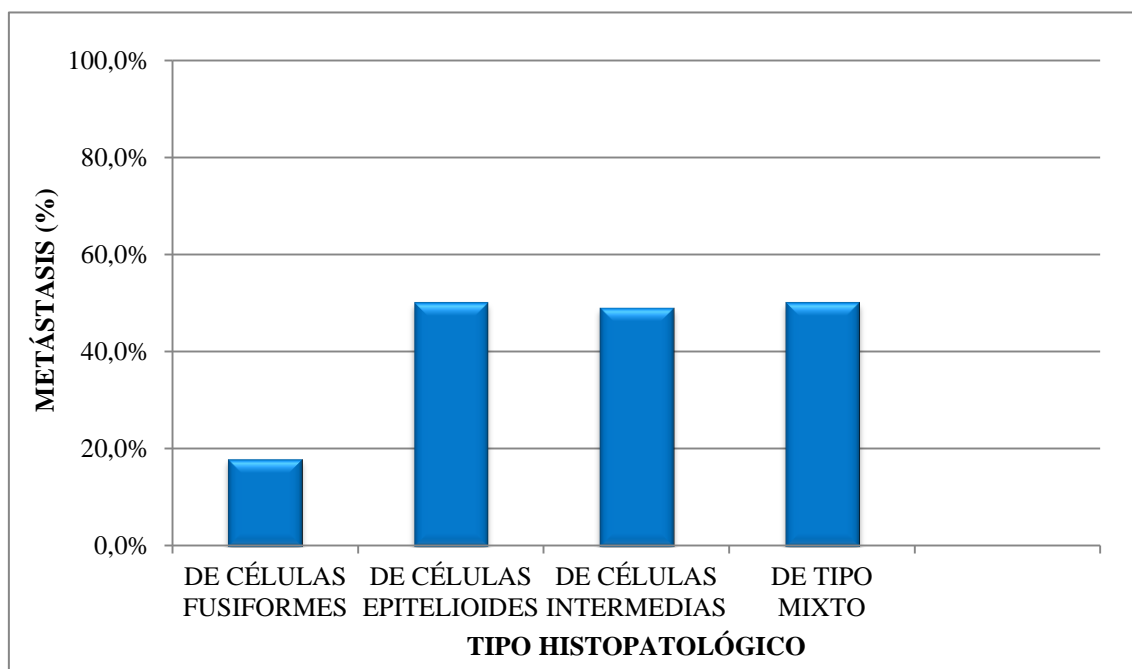


Figura 74. Relación entre los tipos histopatológicos y metástasis.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tipos histológicos y la supervivencia (*Fig.7.6*).

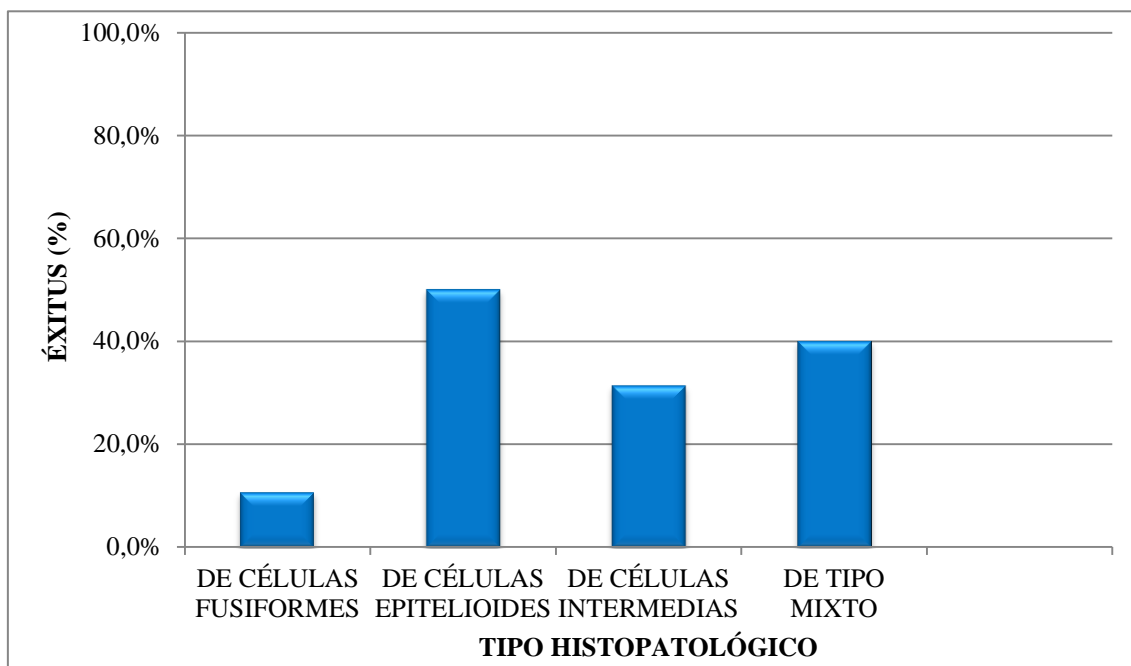


Figura 75. Relación entre el tipo histopatológico y éxitos.

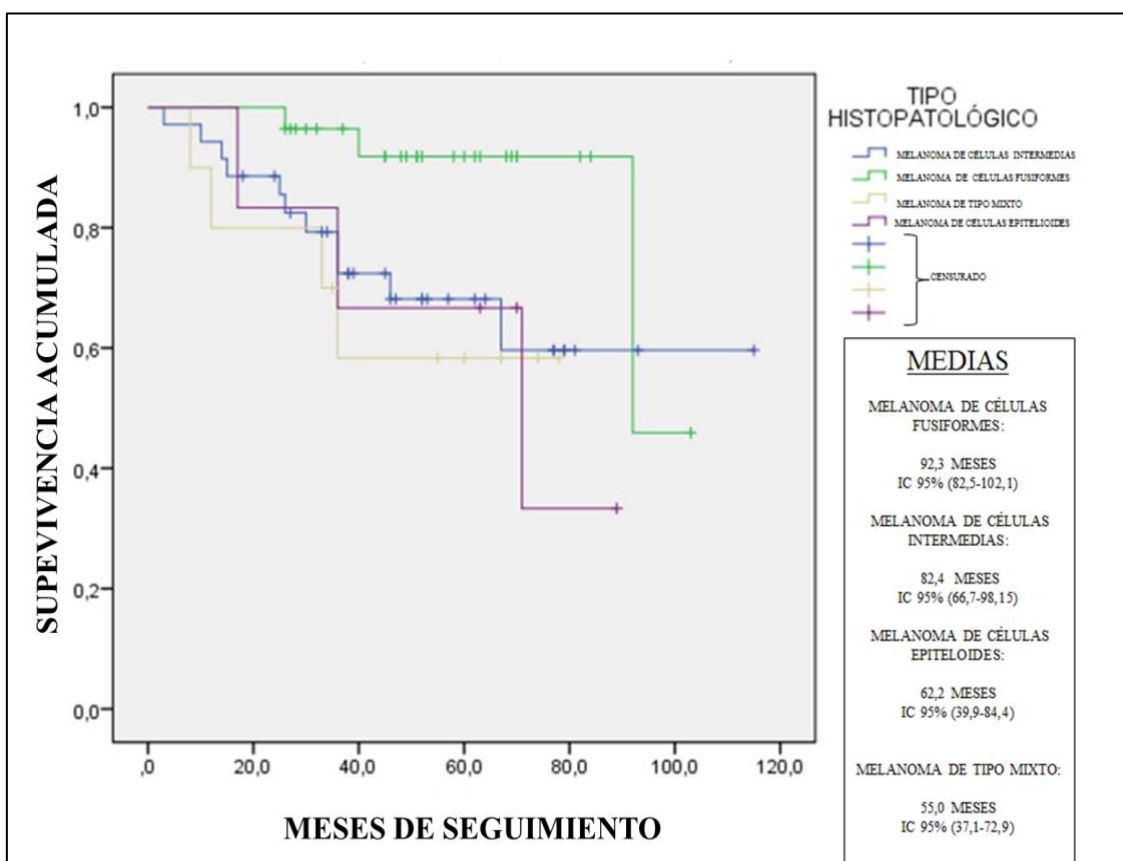


Figura 76. Relación entre el tipo histopatológico y supervivencia.

4.- PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MICRO-AMBIENTE INFLAMATORIO

4.1.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD68

La inmunoexpresión para anti-CD68 fue la siguiente: 17 casos (21,5%) sólo en células aisladas (1+); 33 (41,8%) numerosas células inmunopositivas (2+) y 29 casos (36,7%) muy abundantes células positivas (3+) (*Fig.77-78*).

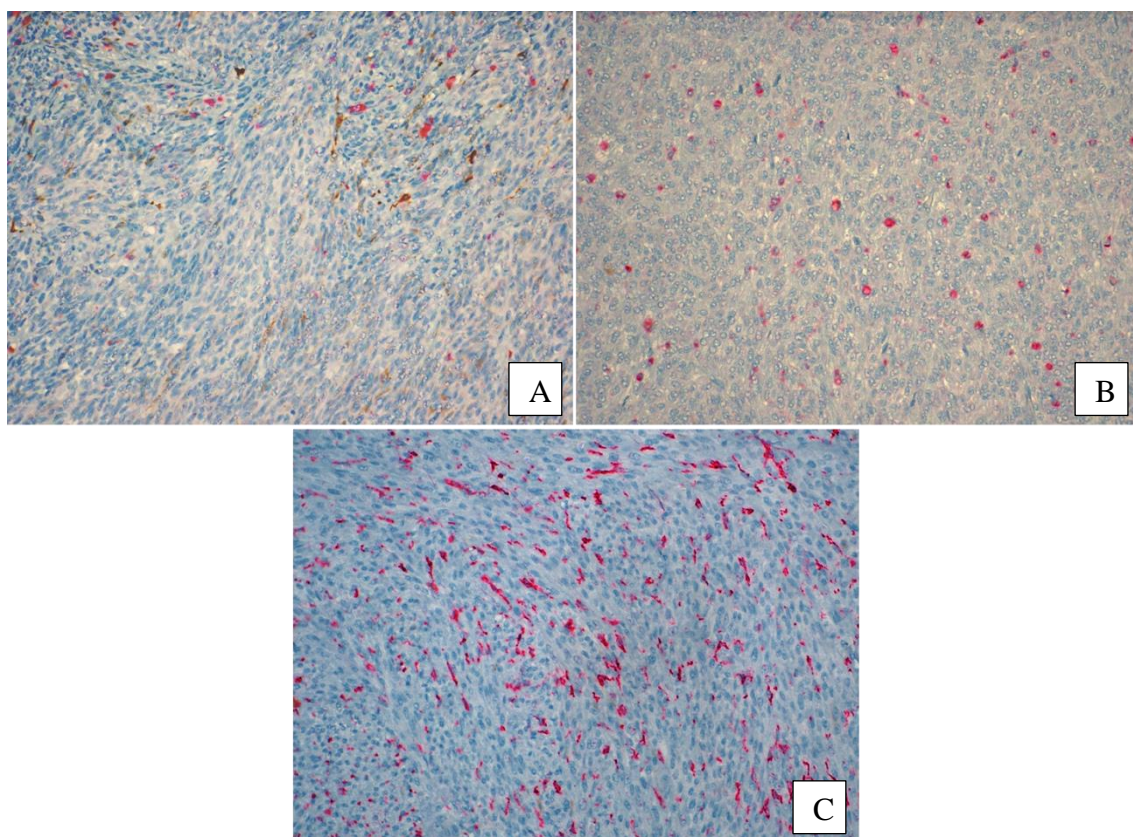


Figura 77. Inmunoexpresión anti-CD68 (20x): A) (1+); B) (2+) y C) (3+).

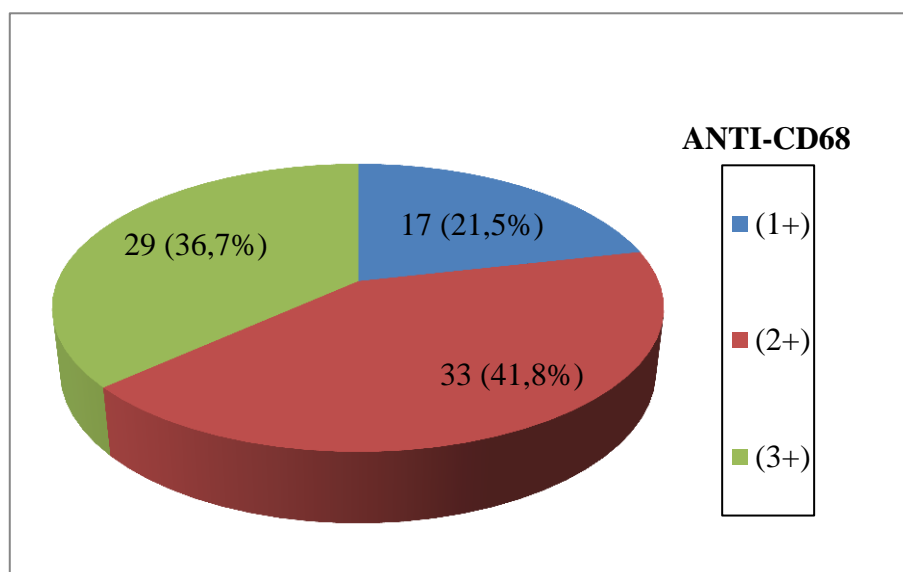


Figura 78. Clasificación de los casos según la expresión del anticuerpo anti-CD68.

El tipo predominante de células anti-CD68 positivas fue el tipo redondo (61 casos, 77,2%) frente al de hábito dendrítico (18 casos, 22,8%) (Fig.47). Excluidos los 17 casos en los que el número total de anti-CD68 fue categorizado como (1+), en los 62 casos restantes, 36 (58,1%) mostraron un patrón de células dispersas, en 25 (40,3%) el patrón fue perivascular y en un único caso (1,6%) el patrón fue difuso con formación de mallas celulares (Fig.79).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de anti-CD68 (+) con respecto a la edad, el sexo o el número de mitosis/40 CGA.

El melanoma de células fusiformes se asoció a una escasa población de células anti-CD68 (+) mientras que el melanoma de células epitelioides se relacionó con número muy abundante de población acompañante anti-CD68 (+), aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. Los melanomas de células intermedias mostraron en un 91,4% de los casos una expresión anti-CD68 (2+/3+) (Fig 80-81).

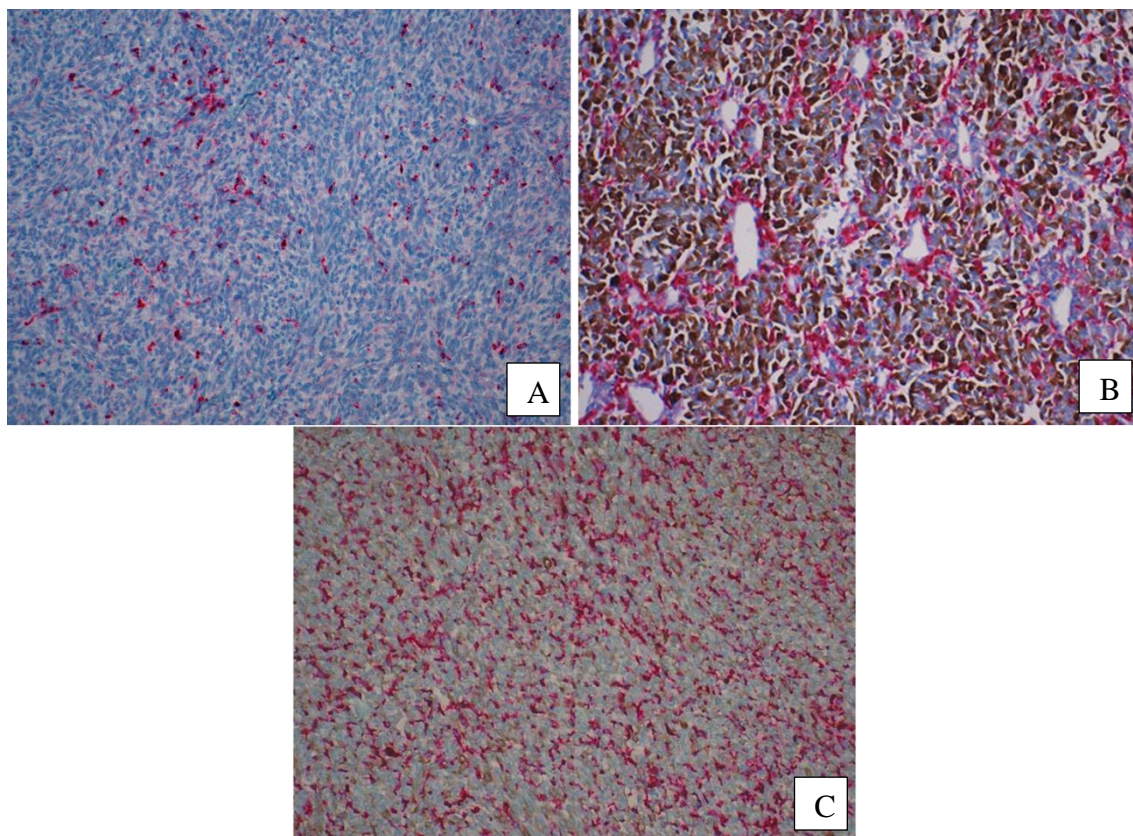


Figura 79. Inmunoeexpresión anti-CD68 (20x): A) patrón de células dispersas; B) patrón perivascular y C) patrón difuso con formación de mallas celulares.

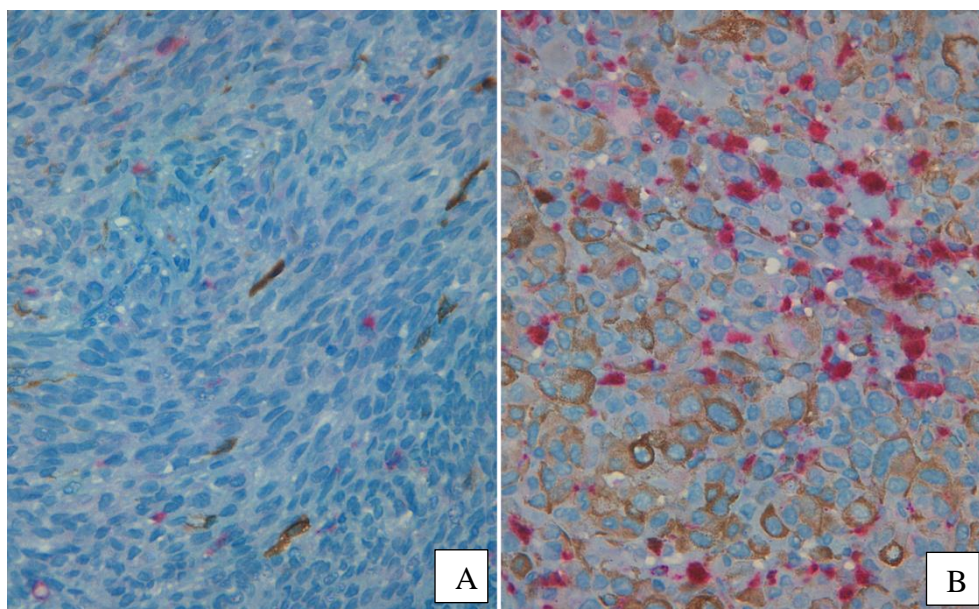


Figura 80. A) Melanoma de células fusiformes con escaso número de células anti-CD68; B) melanoma de células epitelioides con número muy abundante de células anti-CD68.

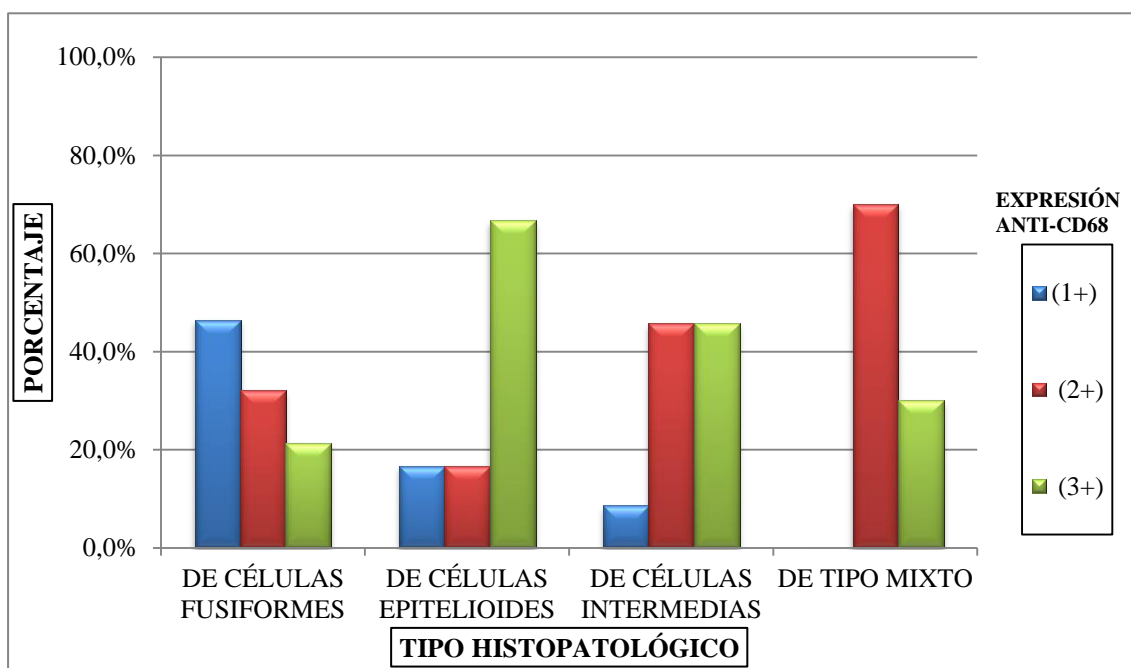


Figura 81. Relación entre el tipo histopatológico y la expresión de anti-CD68.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la relación entre el número de células anti-CD68 (+) y la localización del tumor. Aunque nuestro grupo de melanomas uveales localizados en el cuerpo ciliar es pequeño todos ellos presentaron un alto número de células anti-CD68 (+), es decir, todos fueron anti-CD68 (2+/3+).

Al analizar la relación entre el número de células anti-CD68 (+) y la aparición de recidiva, se observó que los dos casos que recidivaron mostraron un número de células anti-CD68 (2+/3+).

La mayoría (86,6%) de los melanomas uveales que metastatizaron presentaron un número de células anti-CD68 (2+/3+) (Fig.82).

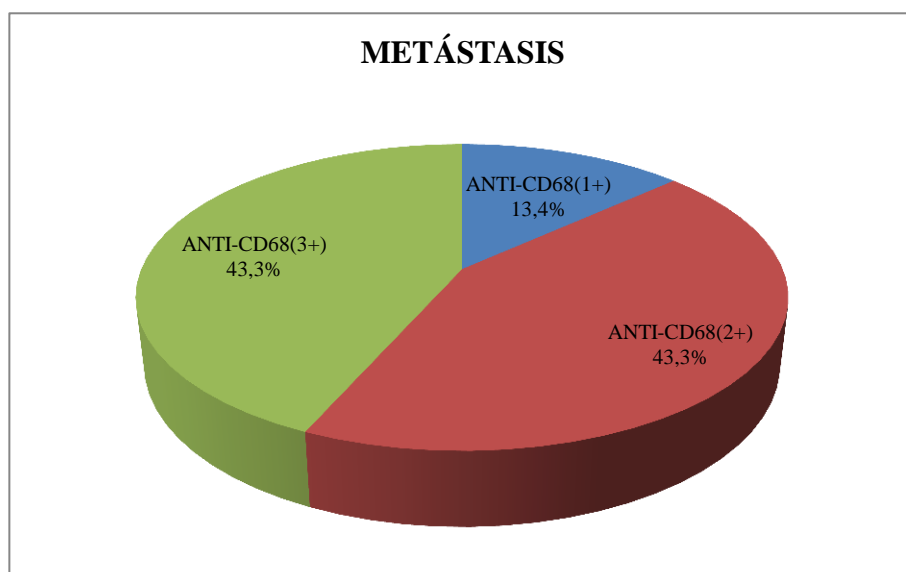


Figura 82. Expresión de anti-CD68 y aparición de metástasis.

La mayor parte de los pacientes que murieron por melanoma (85,7%) presentaron un porcentaje elevado de células anti-CD68 pero no hubo diferencias muy significativas con respecto a los que no fallecieron.

En cuanto a la supervivencia no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos establecidos de células con inmunotinción positiva para anti-CD68 (Fig.83).

Analizamos la posible relación entre la categoría tumoral y la expresión de anti-CD68, encontrándose que los tumores de categoría tumoral T1 se asociaban con una escasa población de células anti-CD68 (+) y los tumores de mayor categoría tumoral (T2 a T4) lo hacían con un numeroso o muy abundante número de población acompañante anti-CD68 (Fig 84).

Los tumores en estadios iniciales (estadio I) se asociaron con más frecuencia a un menor número de células anti-CD68 (+) mientras que aquellos tumores en estadios avanzados (estadio IV) se asociaron a un elevado número de células anti-CD68 (+) (Fig.85).

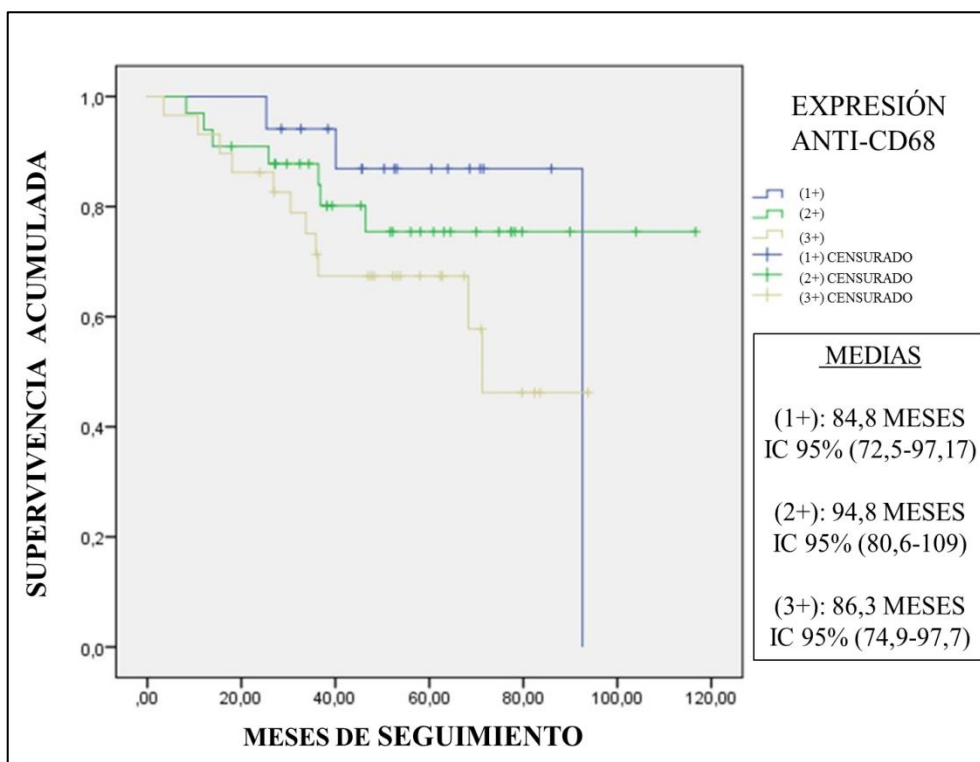


Figura 83. Supervivencia en función de la expresión de anti-CD68.

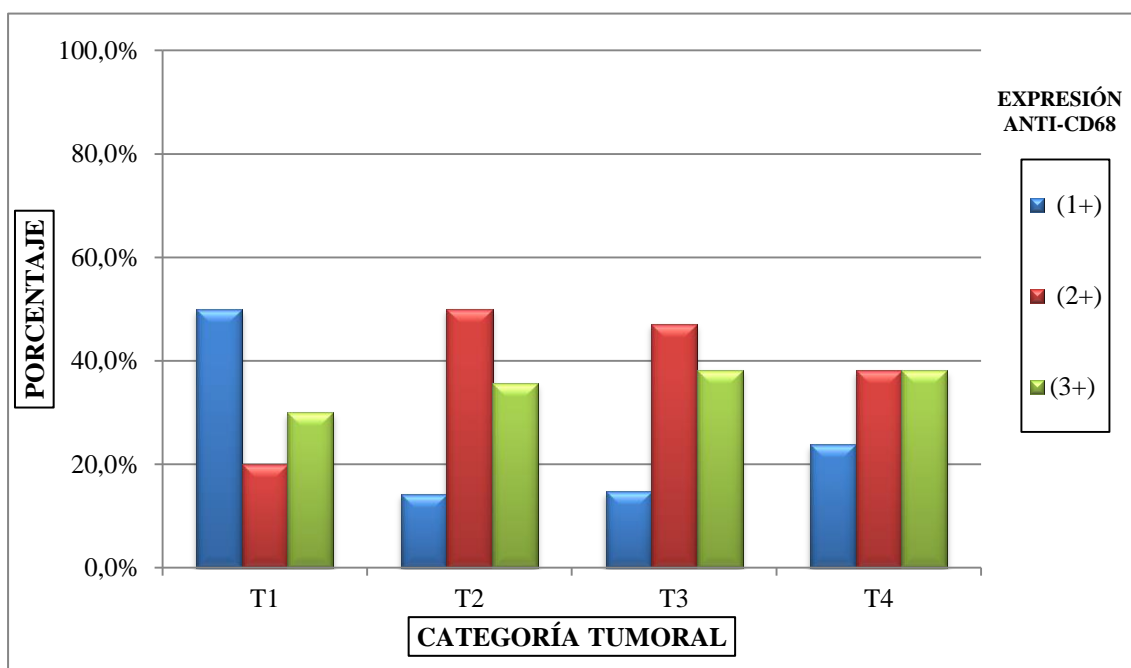


Figura 84. Relación entre categoría tumoral y expresión de anti-CD68.

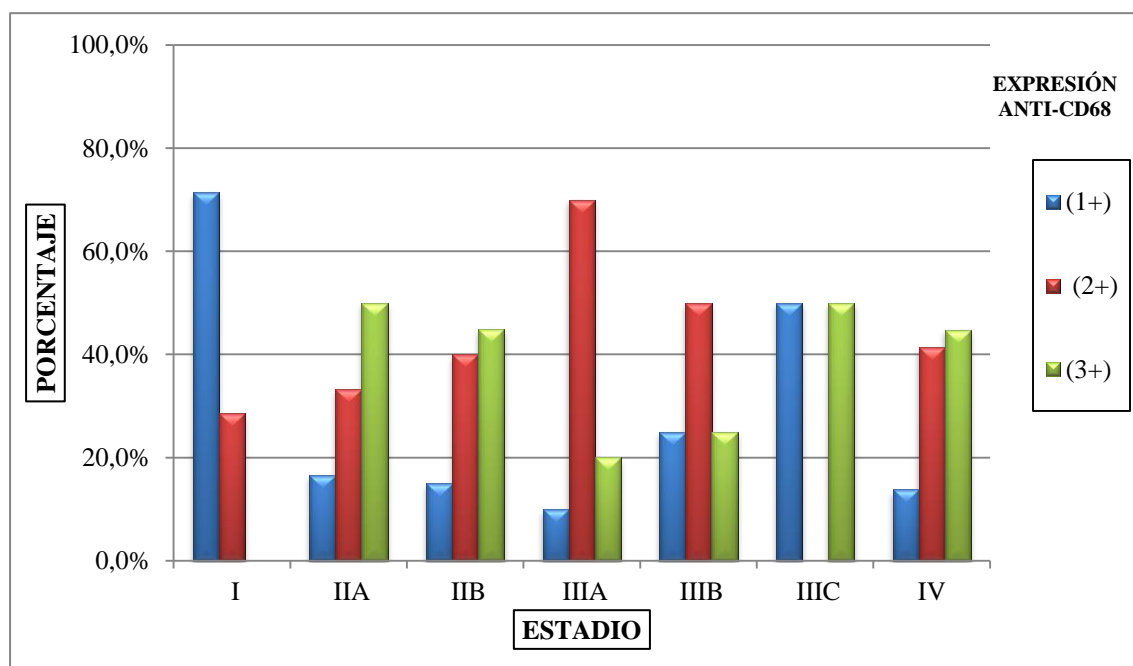


Figura 85. Relación entre el estadio TMN y la expresión de anti-CD68.

Considerando los tres patrones de crecimiento que pueden adoptar los melanomas uveales (focal, difuso plano o difuso en anillo), destacamos que los melanomas con patrón de crecimiento difuso plano mostraron un elevado número de células anti-CD68 (+).

Respecto al grado de pigmentación y el número de células anti-CD68 (+), se obtuvo que los tumores amelanóticos estaban asociados con mayor frecuencia a un número de células anti-CD68 (3+) ($p=0,08$) (Fig. 86). La necrosis fue más habitual y extensa en tumores con expresión de anti-CD68 (2+/3+).

Se analizó la relación entre la afectación del cuerpo ciliar y el número de células anti-CD68, observándose que los melanomas con afectación del cuerpo ciliar presentaron con mayor frecuencia una expresión de anti-CD68 (2+/3+) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo (Fig.87).

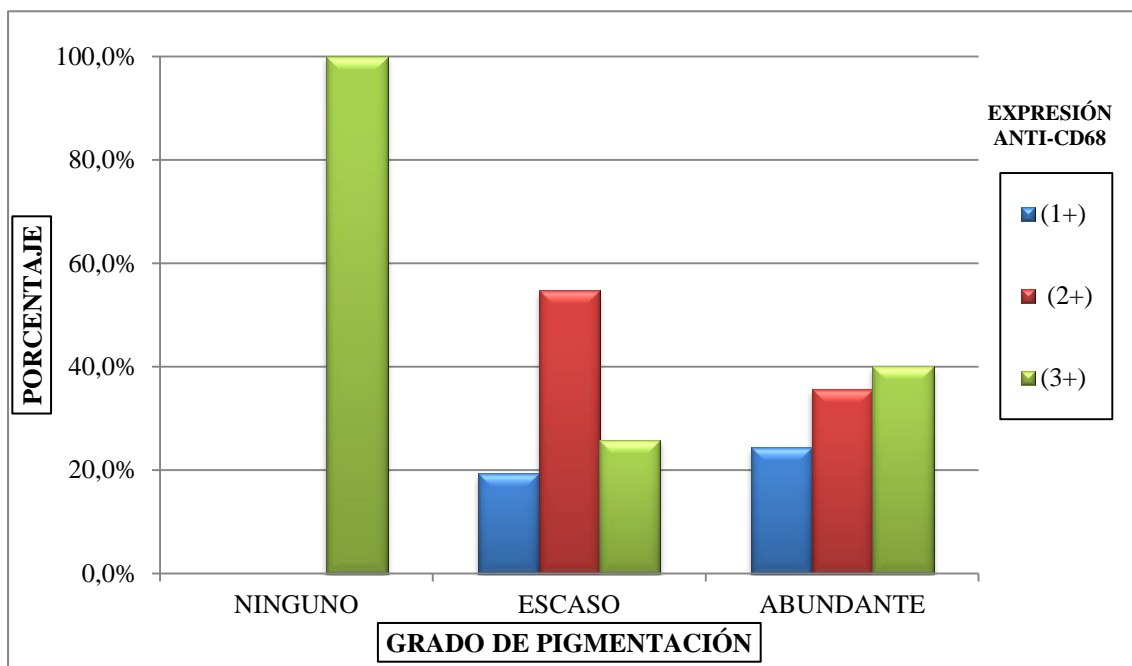


Figura 86. Relación entre el grado de pigmentación y la expresión de anti-CD68.

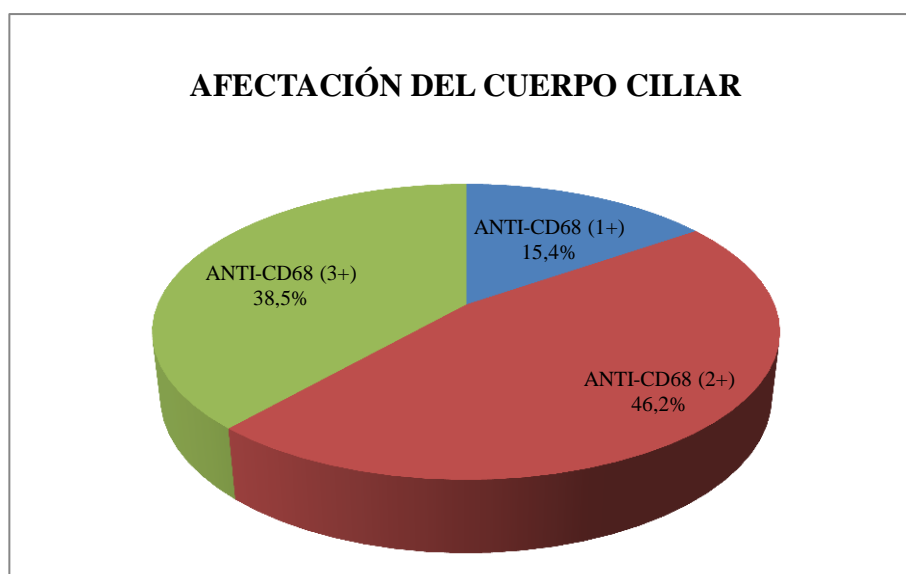


Figura 87. Expresión de anti-CD68 y afectación del cuerpo ciliar.

Al evaluar la relación entre el número de células anti-CD68 y la invasión vascular, se observó que los dos casos con invasión vascular presentaron un número de células anti-CD68 (2+/3+). El único caso de melanoma uveal con invasión del nervio óptico postlaminar presentó un número muy abundante de células acompañantes anti-CD68.

La mayoría (81,9%) de los melanomas uveales que rebasaron la esclera presentaron elevado número de células anti-CD68 (*Fig.88*).

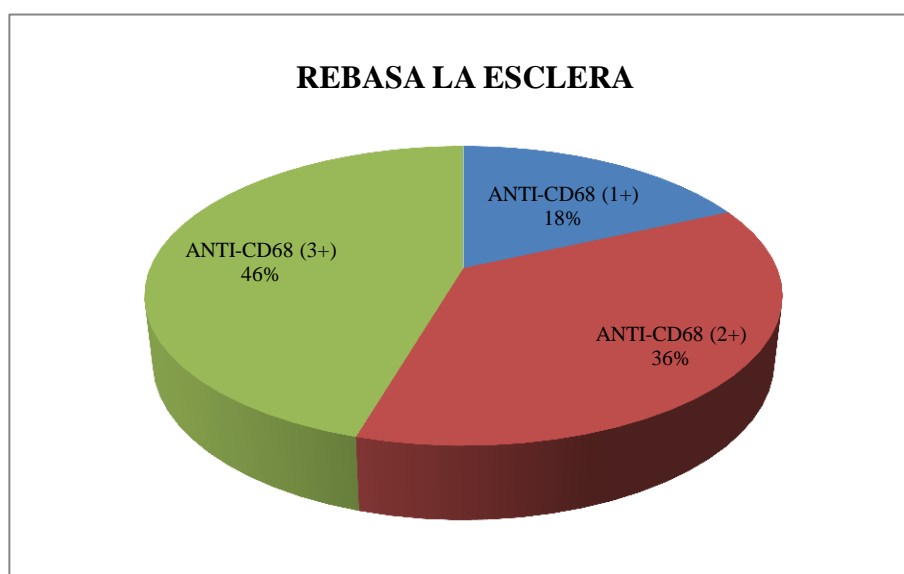


Figura 88. Expresión de anti-CD68 y afectación extraescleral.

Al analizar la relación entre el número de células anti-CD68 y el tipo predominante de estas células acompañantes, se observó que existía una asociación estadísticamente significativa ($p=0,012$). Los tumores que presentaban un escaso número de células anti-CD68 se asociaban con un predominio de células anti-CD68 redondas mientras que los melanomas con un número muy abundante de células anti-CD68 se relacionaban con un predominio de células anti-CD68 de hábito dendrítico (*Fig.89*).

El tipo de célula predominante anti-CD68 presentó asociación estadísticamente significativa con el grado de pigmentación tumoral ($p=0,001$). El tipo redondo se asoció con melanomas con abundante pigmentación y el tipo de hábito dendrítico con tumores amelanóticos o con escasa pigmentación. Así mismo existió asociación entre el tipo de

célula anti-CD68 y el patrón de distribución de estas células acompañantes ($p=0,001$). El tipo redondo se asoció con el patrón perivascular mientras que el tipo de hábito dendrítico con el patrón de células dispersas. Al estudiar la relación entre el tipo predominante de anti-CD68 y el índice de mitosis, obtuvimos que el tipo redondo presentó menor número de mitosis que el tipo de hábito dendrítico ($p=0,002$).

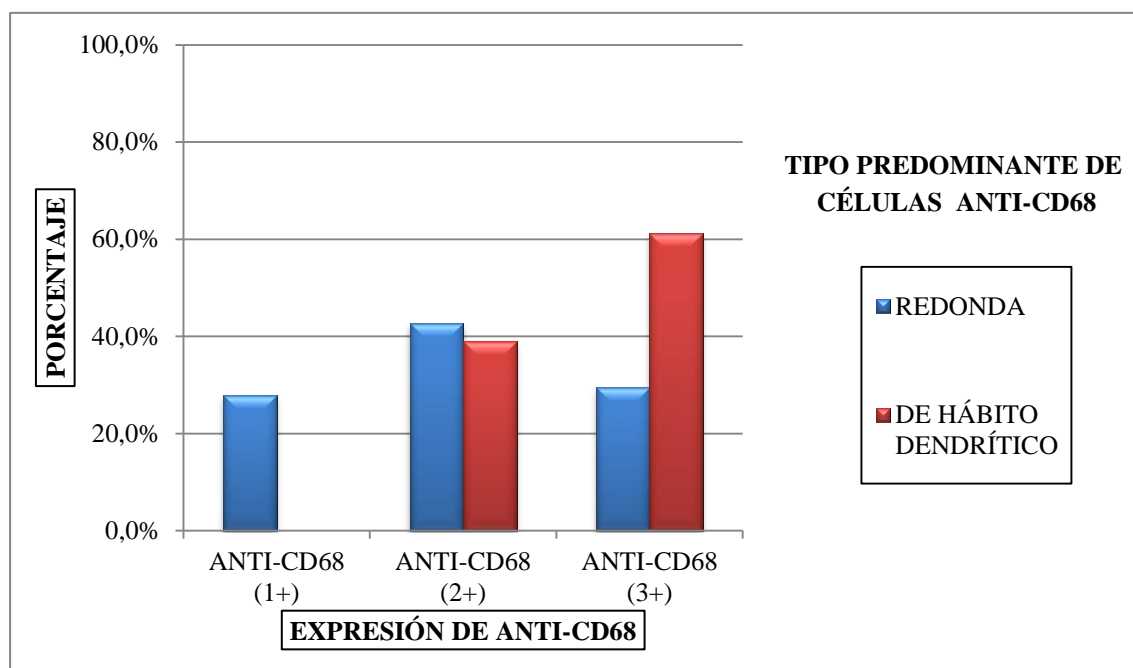


Figura 89. Relación entre el número de células anti-CD68 y el tipo predominante.

En resumen, los melanomas con numerosas (2+) o muy abundantes (3+) células anti-CD68 acompañantes son en su mayor frecuencia (y tiene tendencia a la significación) los melanomas epitelioides, aquellos que metastatizan y/o recidivan. Son también más abundantes en los melanomas de pacientes que fallecen por la neoplasia y en aquellos que se presentan en estadios avanzados y con mayor categoría tumoral, así como en los tumores amelanóticos, los que tienen necrosis, presentan invasión vascular, un patrón de crecimiento difuso e infiltran y rebasan la esclera.

4.2.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD163

La inmunoexpresión para anti-CD163 fue la siguiente: 13 casos (16,5%) sólo presentaron células aisladas (1+); 22 casos (27,8%) mostraron numerosas células inmunopositivas (2+) y 44 casos (55,7%) tenían un número muy abundante de células positivas (3+) (*Fig.90-91*).

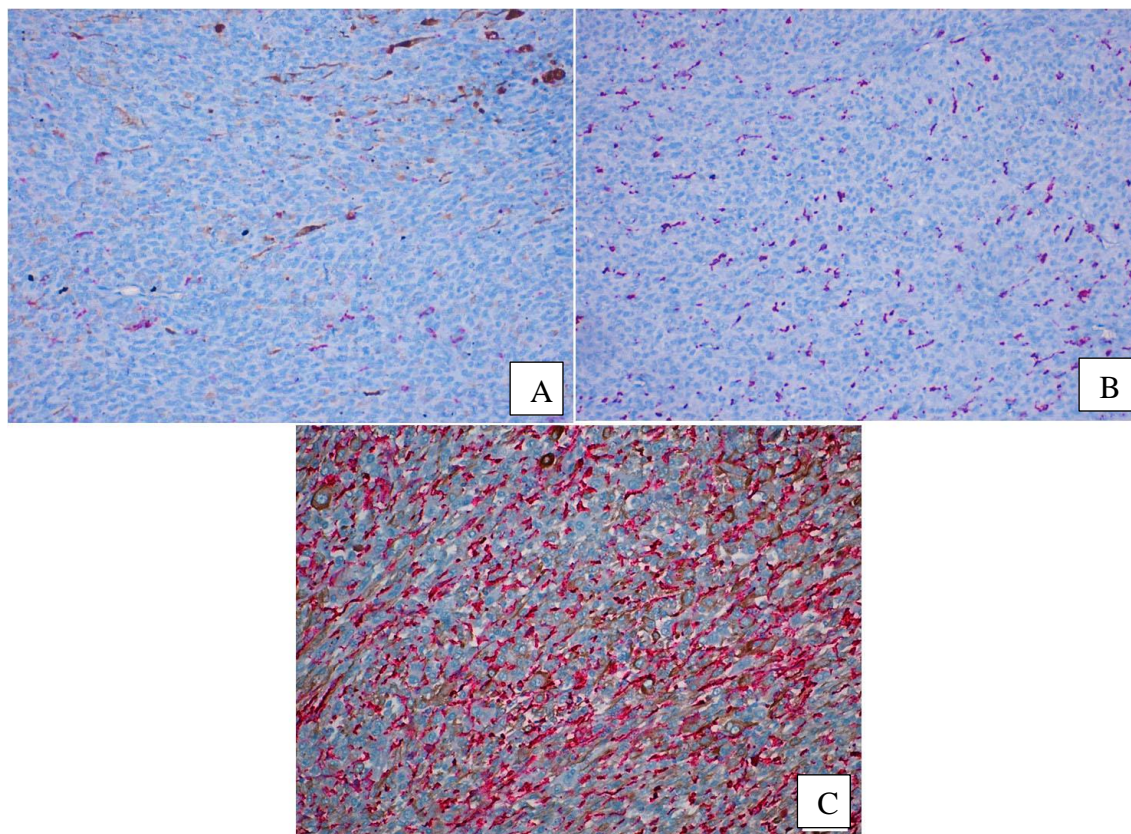


Figura 90. Inmunoexpresión anti-CD163 (20x): A) (1+); B) (2+) y C) (3+).

En cuanto a la inmunoexpresión de anti-CD163 no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al sexo, la edad, la localización tumoral, la categoría tumoral, la invasión vascular, la recidiva y el número de mitosis/40 CGA.

El melanoma de células fusiformes se asoció con mayor frecuencia a una escasa población de células anti-CD163 mientras que el melanoma de células epitelioides se relacionó con un número muy abundante de población acompañante anti-CD163(+), aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. Los seis casos de melanomas de células epitelioides presentaron un elevado número de población anti-CD163.

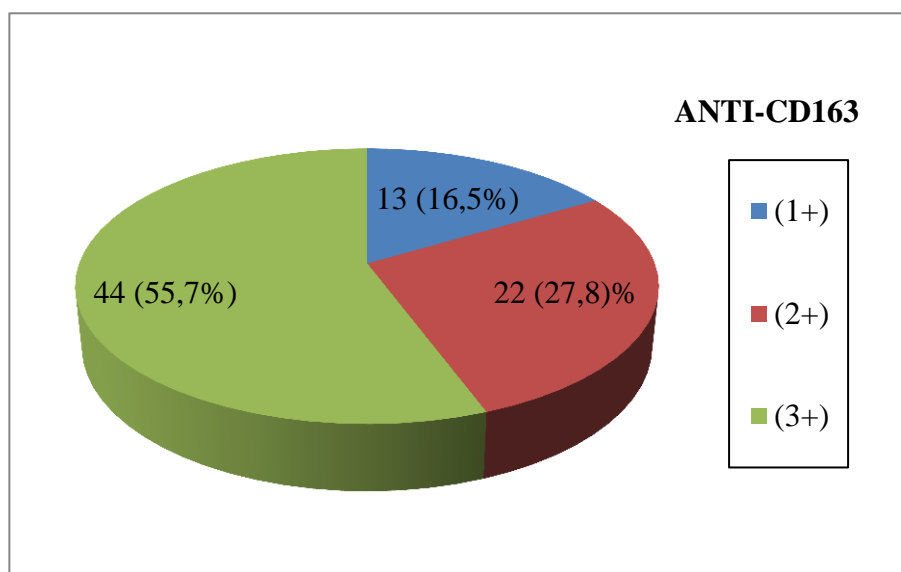


Figura 91. Clasificación de los casos según la expresión del anticuerpo anti-CD163.

La mayor parte de los tumores que metastatizaron (86,7%) presentaron un porcentaje elevado de células anti-CD163, (2+/3+) pero no hubo diferencias muy significativas con respecto a los que no metastatizaron.

La mayoría (81%) de los pacientes que fallecieron por melanoma uveal mostraron un número de células anti-CD163 (2+/3+) aunque sin existir diferencias significativas con los pacientes que no fallecieron.

Con respecto a la supervivencia no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos establecidos de células con inmunotinción positiva para anti-CD163 (Fig.92).

Los tumores en estadios iniciales (estadio I) se asociaron con más frecuencia a un menor número de células anti-CD163 (+) mientras que aquellos tumores en estadios avanzados (estadio IV) lo hicieron a un elevado número de células anti-CD163 (+) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Considerando los tres patrones de crecimiento que pueden adoptar los melanomas uveales (focal, difuso plano o difuso en anillo), destacamos que los melanomas con patrón de crecimiento difuso plano mostraron un elevado número de células anti-CD163 (+).

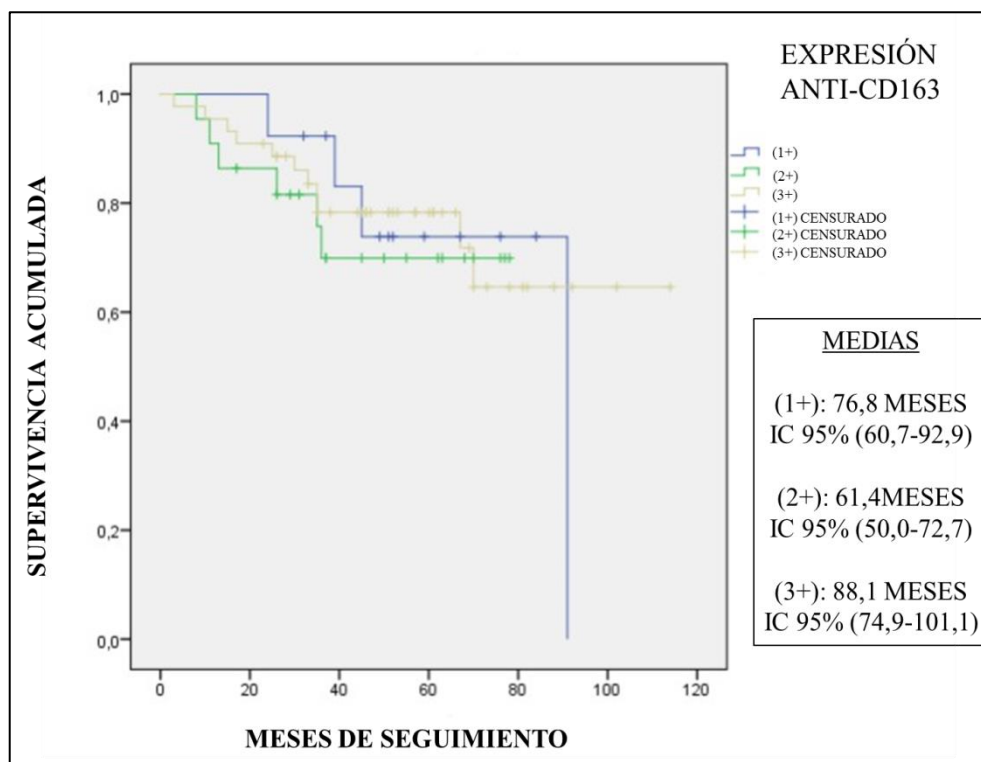


Figura 92. Supervivencia en función de la expresión de anti-CD163.

Respecto al grado de pigmentación y el número de células anti-CD163 (+), se obtuvo que los tumores con abundante pigmento estaban asociados con mayor frecuencia a un número de células anti-CD68 (1+), sin llegar a ser estadísticamente significativo. La necrosis fue más habitual y >50% en tumores con expresión de anti-CD163 (3+).

Se analizó la relación entre la afectación del cuerpo ciliar y el número de células anti-CD163, observándose que los melanomas con afectación del cuerpo ciliar presentaron con mayor frecuencia una expresión de anti-CD163 (2+/3+) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo (*Fig.93*).

El único caso de melanoma uveal con invasión del nervio óptico postlaminar presentó un número muy abundante células acompañantes anti-CD163.

La mayoría (81,8%) de los melanomas uveales que rebasaron la esclera presentaron elevado número de células anti-CD163 (*Fig.94*).

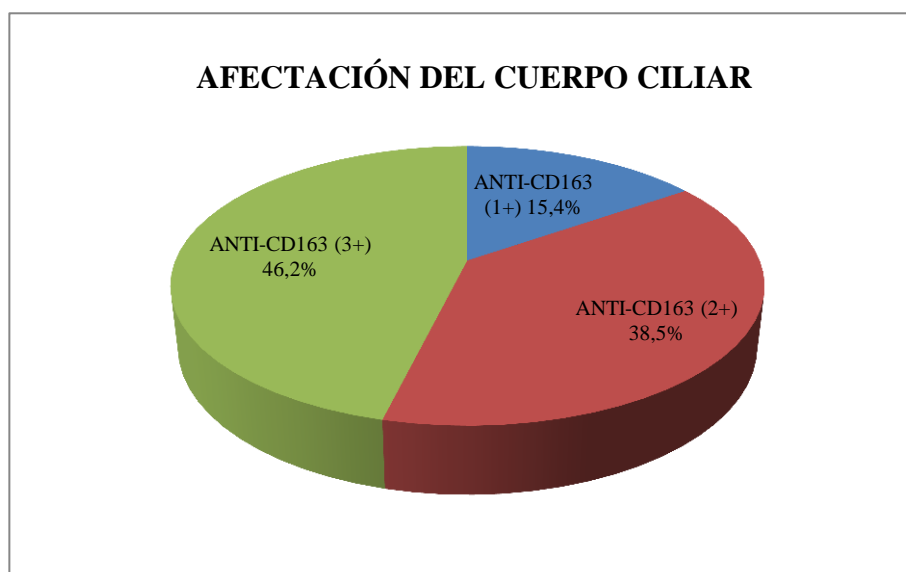


Figura 93. Expresión de anti-CD163 y afectación del cuerpo ciliar.



Figura 94. Expresión de anti-CD163 y afectación extraescleral.

En resumen, los melanomas con numerosas (2+) o muy abundantes (3+) células anti-CD163 acompañantes son en su mayor frecuencia (y tiene tendencia a la significación) los melanomas epitelioides y aquellos que metastatizan. Son también más abundantes en los melanomas de pacientes que fallecen por la neoplasia y en aquellos que se presentan en estadios avanzados, presentan un patrón de crecimiento difuso e infiltran y rebasan la esclera.

4.3.- COEXPRESIÓN DE ANTI-CD68/ANTI-CD163 Y EXPRESIÓN DE MARCADORES LINFOIDES

Al analizar la posible relación entre el número de células acompañantes anti-CD68 y anti-CD163, obtuvimos que existía una estrecha relación directa entre el número de células anti-CD68 y anti-CD163, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo (*Fig.95*).

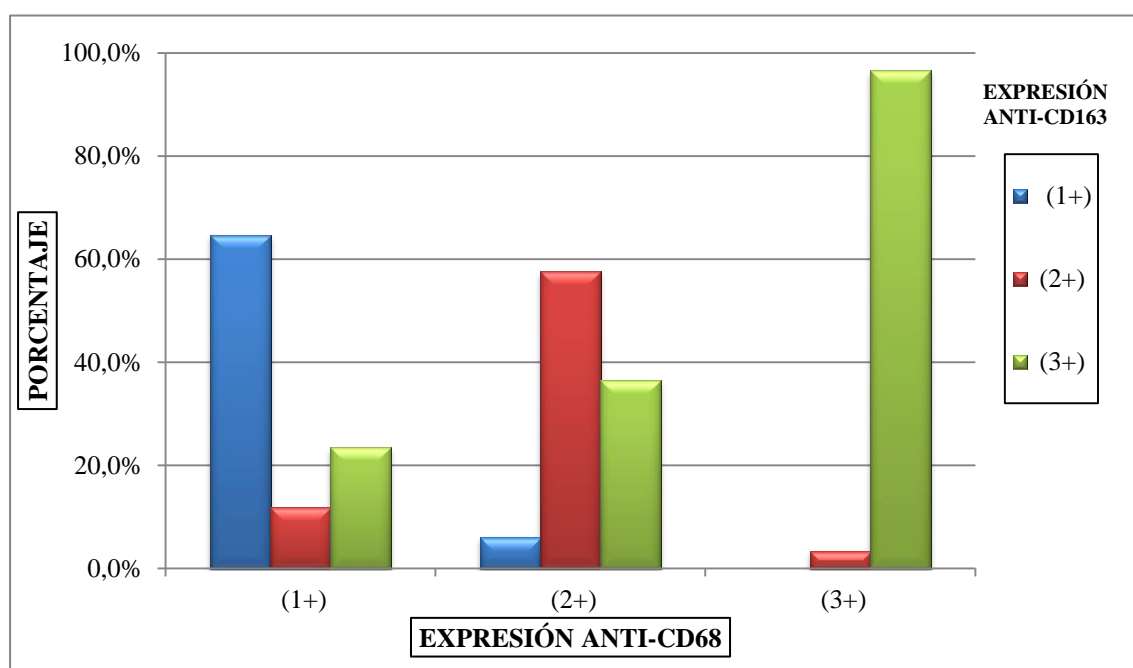


Figura 95. Relación entre el número de células anti-CD68 y anti-CD163.

De los 79 casos estudiados, la inmunorreacción negativa para anti-CD3 se observó en 40 casos (50,6%). La inmunorreacción positiva para anti-CD3 se graduó como (1+) en 26 casos (32,9%) y (2+) en 13 casos (16,5%) (*Fig. 96-98*).

La mayoría de los melanomas fusiformes (64,3%) no presentaron células anti-CD3 positivas mientras que la mayor parte de los melanomas de células epitelioides y de células intermedias (66,7% y 57,2% respectivamente) presentaron células anti-CD3 (1+/2+).

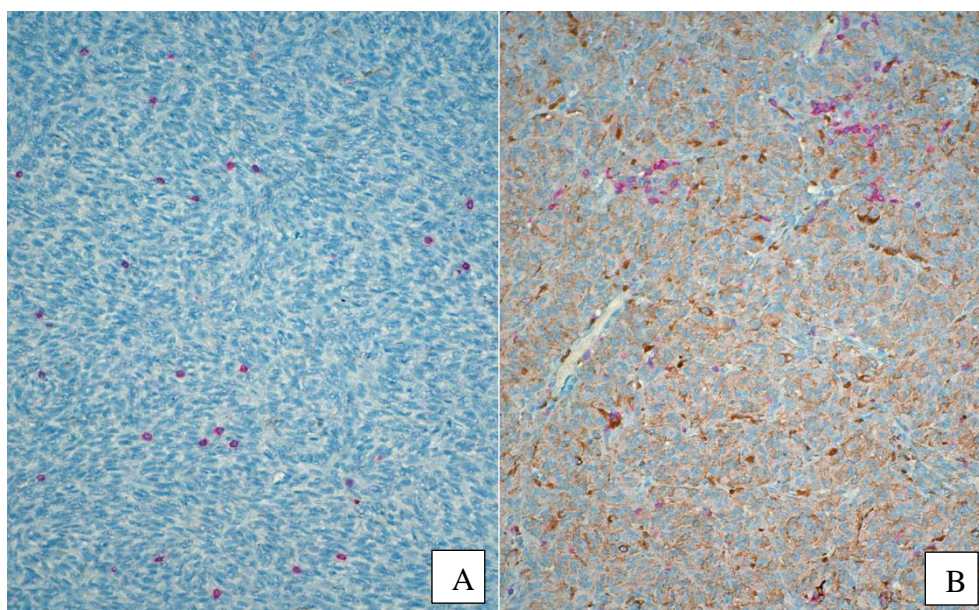


Figura 96. Inmunoeexpresión anti-CD3 (1+) (20x): A) melanoma amelanótico; B) melanoma pigmentado.

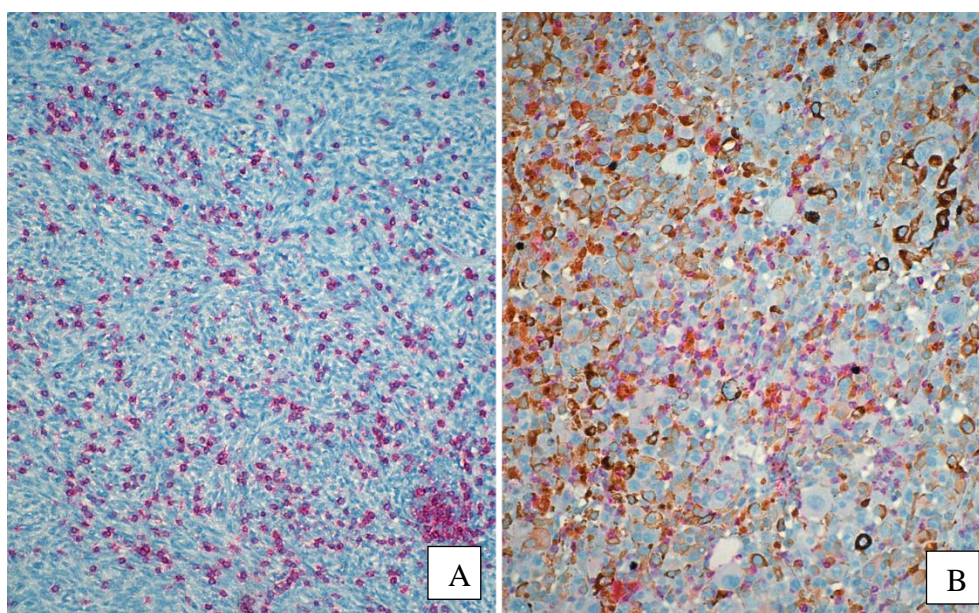


Figura 97. Inmunoeexpresión anti-CD3 (2+) (20x): A) melanoma amelanótico; B) melanoma pigmentado.

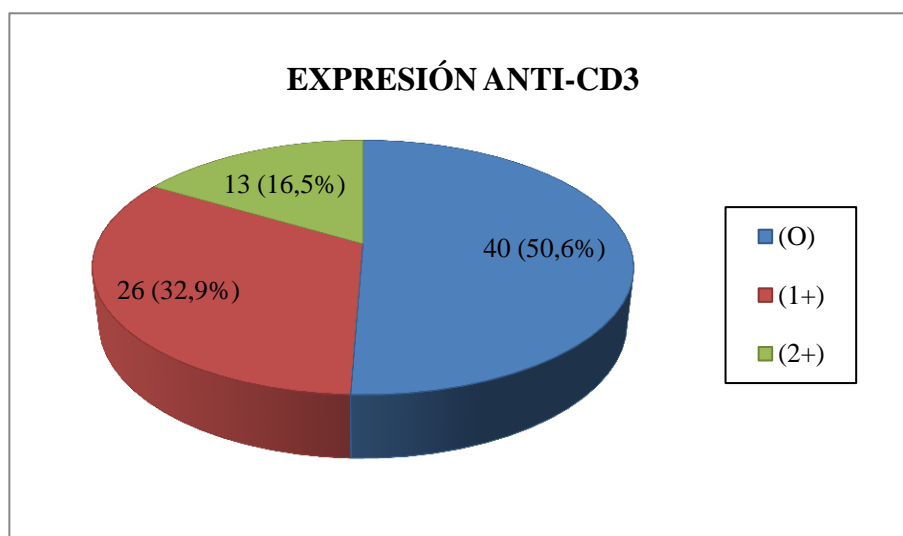


Figura 98. Clasificación de los casos según la expresión del anticuerpo anti-CD3.

El número de células anti-CD3 presentó asociación estadísticamente significativa con el número de células acompañantes anti-CD68 ($p=0,001$) y con el número de células anti-CD163 ($p=0,005$). Un escaso número de células anti-CD68 y anti-CD163 se asoció con la ausencia de células anti-CD3 mientras que un elevado número de células anti-CD68 y anti-CD163 se relacionó con un abundante número de células anti-CD3 (Fig.99).

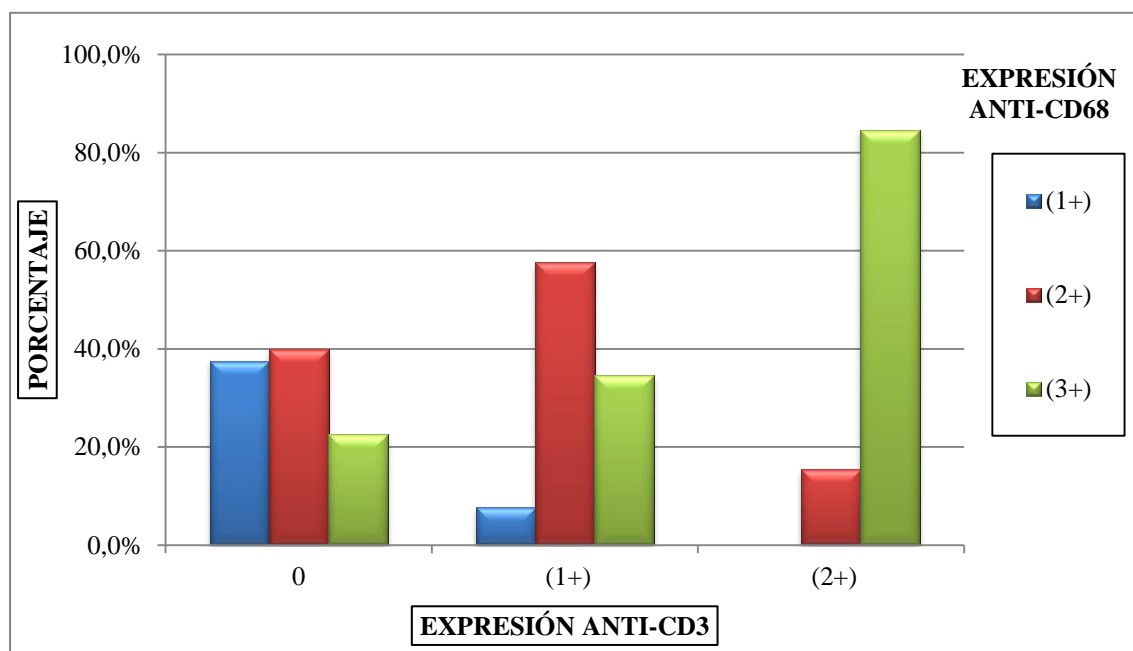


Figura 99. Relación entre el número de células anti-CD68 y anti-CD3.

RESULTADOS

Al estudiar la relación entre el número de células anti-CD3 y el tipo predominante de célula anti-CD68 se observó la existencia de una asociación estadísticamente significativa , con un valor de $p=0,001$. El tipo de célula predominante anti-CD68 redonda se asoció con la ausencia de células anti-CD3 acompañante y el tipo de hábito dendrítico se relacionó con un abundante número de células anti-CD3.

En los 13 casos graduados con inmunorreacción positiva para anti-CD3 como (2+) se determinó:

- ❖ El cociente anti-CD4/anti-CD8. En ocho casos (61,5%) existió un predominio de anti-CD8 mientras que en cinco casos (38,5%) el anti-CD4 fue igual al anti-CD8 (*Fig.100-101*).

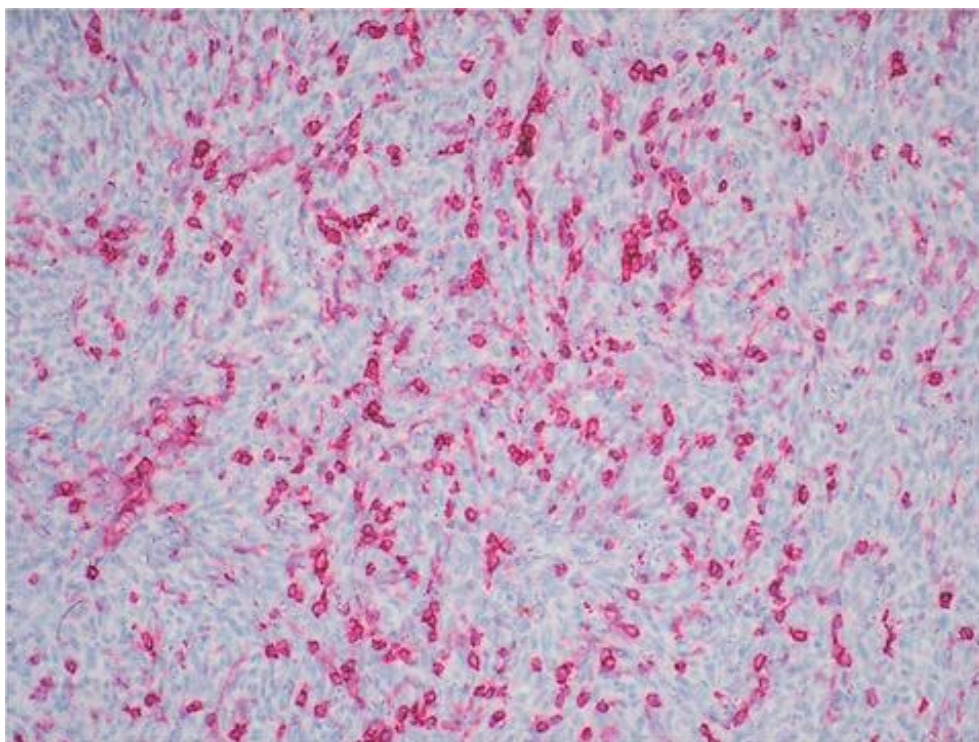


Figura 100. Inmunoexpresión anti-CD4 (20x).

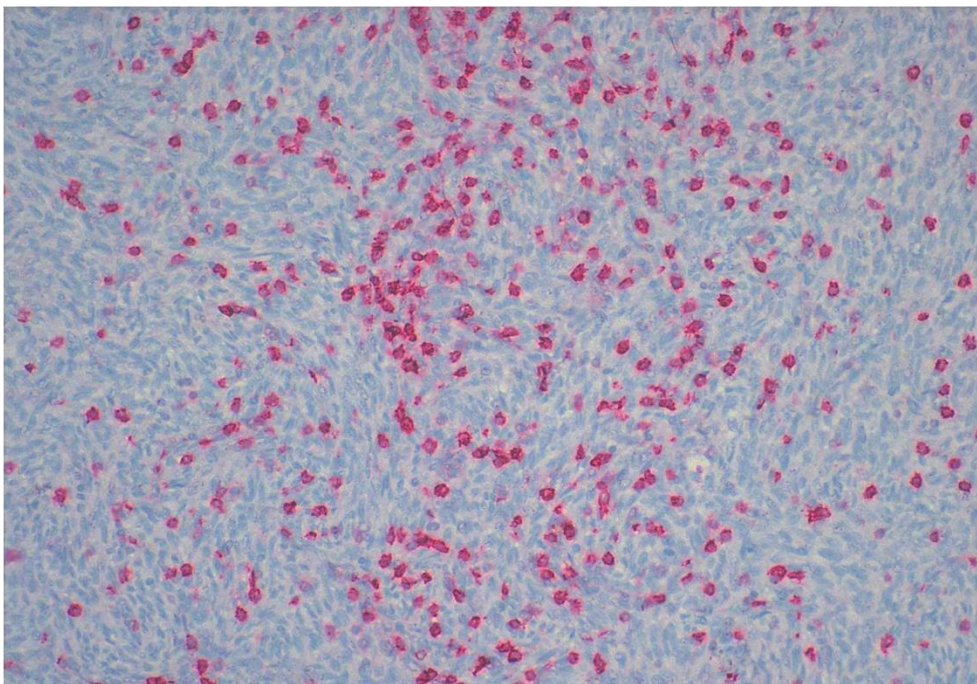


Figura 101. Inmunoeexpresión anti-CD8 (20x).

- ❖ La inmunorreacción para anti-Foxp3. Fue valorada como positiva en cuatro casos (30,8%) y negativa en nueve casos (69,2%) (Fig.102).

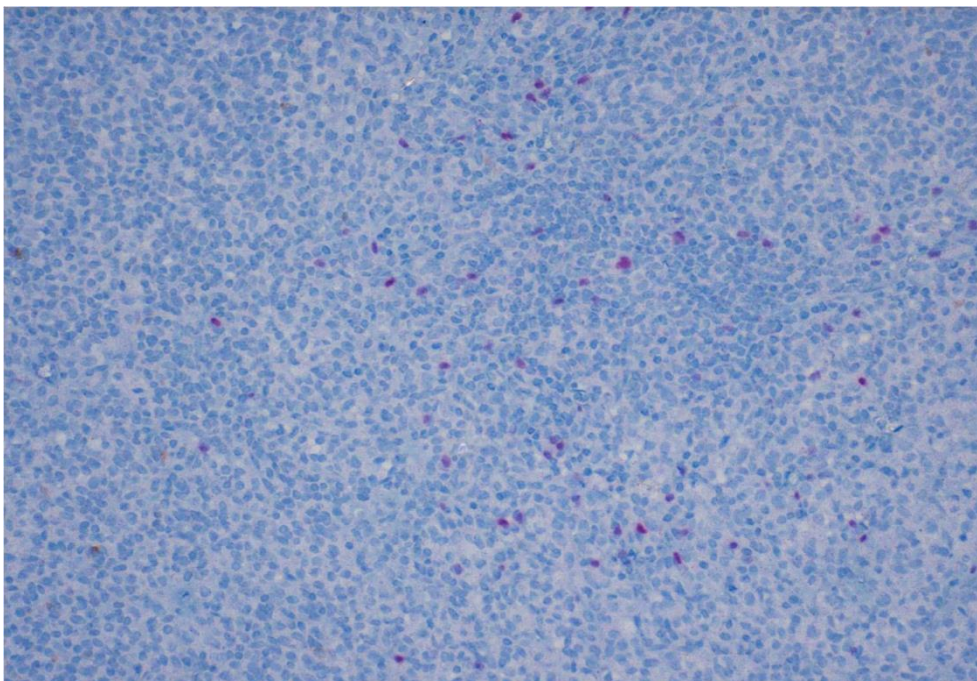


Figura 102. Inmunoeexpresión anti-Foxp3 (20x).

- ❖ La inmunorreacción para anti-CD20. Se graduó como (0) en un caso (7,7%), (1+) en nueve (69,2%) y (2+) en tres casos (3,8%).
- ❖ La inmunorreacción para anti-CD56. En ninguno de los 13 casos se observó expresión positiva para anti-CD56.

En general, los melanomas uveales tienen poca respuesta linfocitaria y no hay diferencias estadísticamente significativas en las distintas subpoblaciones linfocitarias anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3 y anti-CD20 independientemente del tipo histopatológico y del número de células anti-CD68 y anti-CD163.

4.4.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-KI67

De los 43 casos evaluados, 31 (72,1%) presentaron un índice de proliferación $< 20\%$ y 12 casos (27,9%) $\geq 20\%$. La inmunoexpresión positiva para anti-Ki67 oscilaba entre el 1% y el 37% (*Fig. 103*)

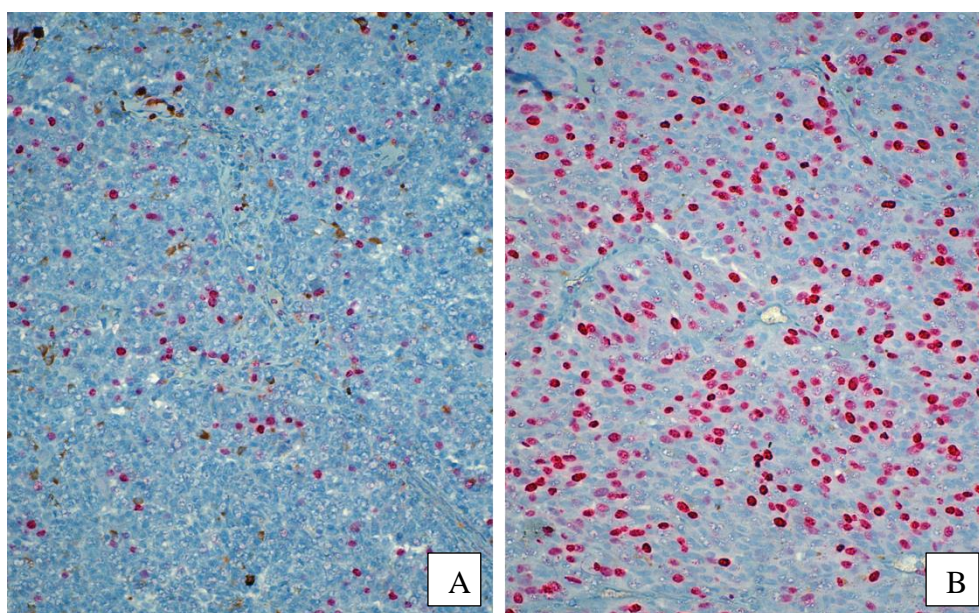


Figura 103. Inmunoexpresión anti-Ki67 (20x): A) índice de proliferación (anti-Ki67) 13%; B) índice de proliferación (anti-Ki67) 48%.

La expresión de anti-Ki67 se relacionó con los tipos histológicos globalmente y la diferencia fundamental apareció entre los melanomas de células fusiformes y los melanomas de células intermedias ($p=0,002$). Los melanomas de células intermedias presentaron mayor índice de proliferación (anti-Ki67) que los melanomas de células fusiformes.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al índice de proliferación (Ki67) en la expresión de células anti-CD68 y anti-CD163 acompañantes.

5.- ALTERACIÓN MOLECULAR: MONOSOMÍA 3

El estudio molecular de la monosomía 3 se realizó mediante la técnica de FISH sobre los cortes de tejido parafinado. Se consideró delección del cromosoma 3 cuando más del 20% de los núcleos presentaron una única señal de hibridación (*Fig.104*).

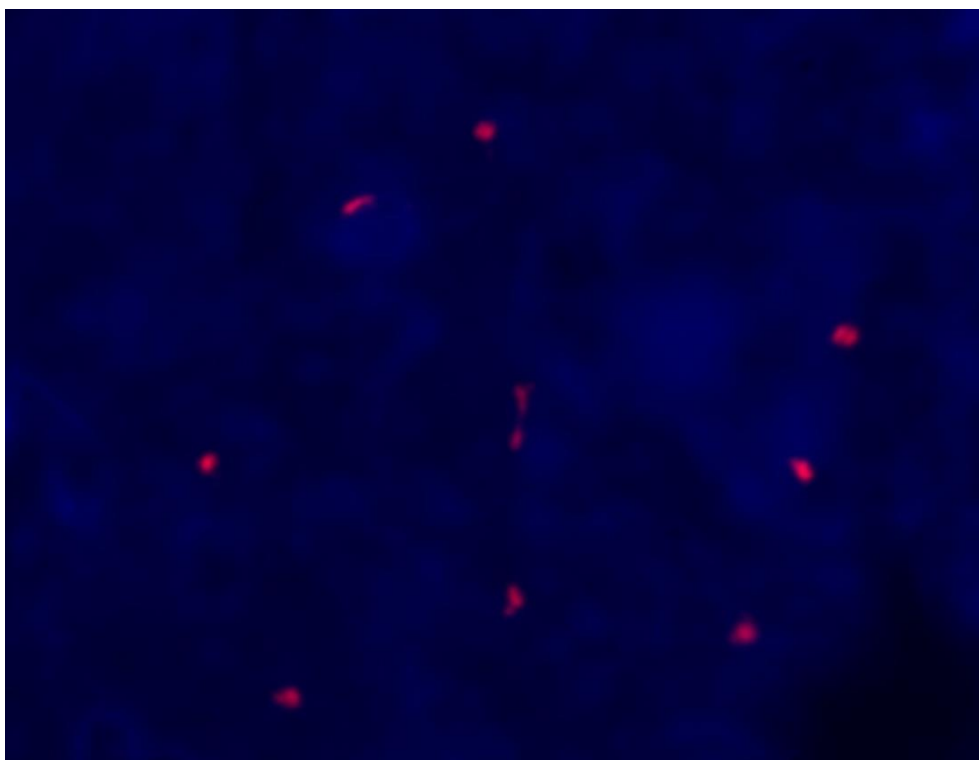


Figura 104. FISH utilizando sonda centromérica CEP3.

De los 79 casos estudiados, 20 (25,3%) mostraron la monosomía 3. En el resto (59 casos, 74,7%) no se detectó dicha delección cromosómica (*Fig.105*).

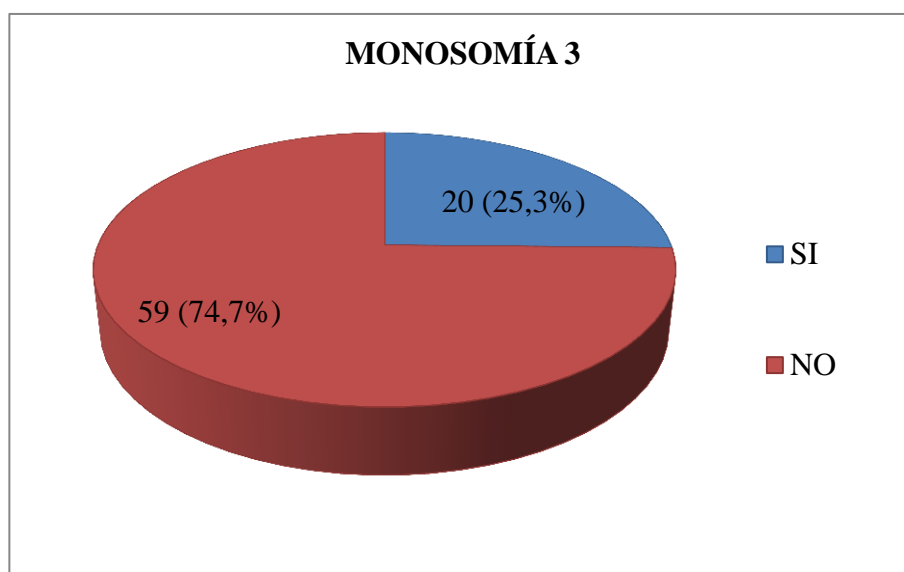


Figura 105. Clasificación de los casos atendiendo a la monosomía 3.

5.1.- MONOSOMÍA 3 Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Atendiendo a las tres localizaciones del melanoma uveal (iris, coroides o cuerpo ciliar) pudimos observar que la delección cromosómica 3 se asoció con mayor frecuencia con los melanomas del cuerpo ciliar aunque sin llegar a ser estadísticamente significativa. El 55,6% de melanomas del cuerpo ciliar presentaron la monosomía 3 frente al 20,3% de los melanomas de coroides. A pesar de que en nuestro grupo de melanomas uveales sólo disponemos de un caso localizado en el iris, éste presentó la monosomía 3.

Aunque no se encontró asociación estadísticamente significativa entre presencia de monosomía 3 y estadio, el 45% de los pacientes que presentaron la monosomía 3 se encontraban en un estadio IV.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de monosomía 3 y el sexo, la edad, el tamaño tumoral, la categoría TMN y la aparición de metástasis.

Los dos casos que recidivaron no mostraron la monosomía 3. En cuanto a la supervivencia global no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o no de monosomía 3 (Fig. 106).

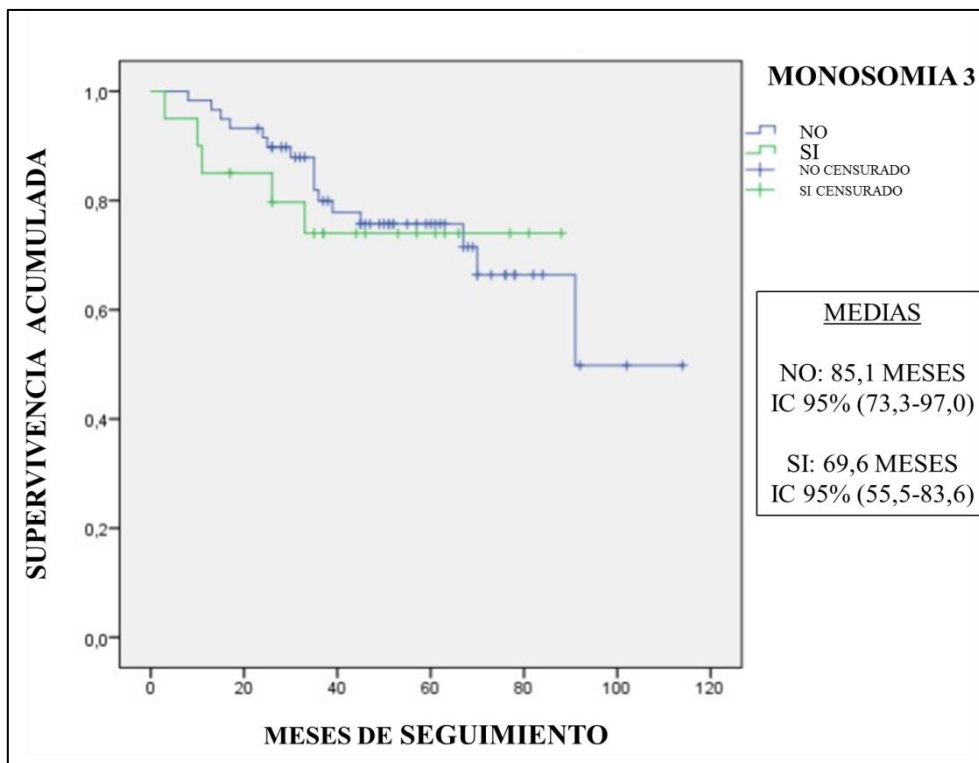


Figura 106. Supervivencia global en función de la presencia o no de monosomía 3.

5.2.- MONOSOMÍA 3 Y TIPO HISTOLÓGICO

En nuestra serie se demostró una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y la presencia de monosomía 3 ($p=0,002$). Los melanomas que se asocian con esta alteración molecular son el melanoma de células intermedias, el de células epitelioides y el de tipo mixto. En general, los melanomas de células fusiformes no se asocian a la monosomía 3 (en sólo el 7,1% de los melanomas de células fusiformes se detectó la delección cromosómica). El porcentaje de casos positivos es muy similar entre el grupo histológico de los melanomas de células epitelioides (33,3%) y el de células intermedias (31,4%) y ligeramente inferior al observado en el grupo de los melanomas de tipo mixto (50%) (Fig. 107).

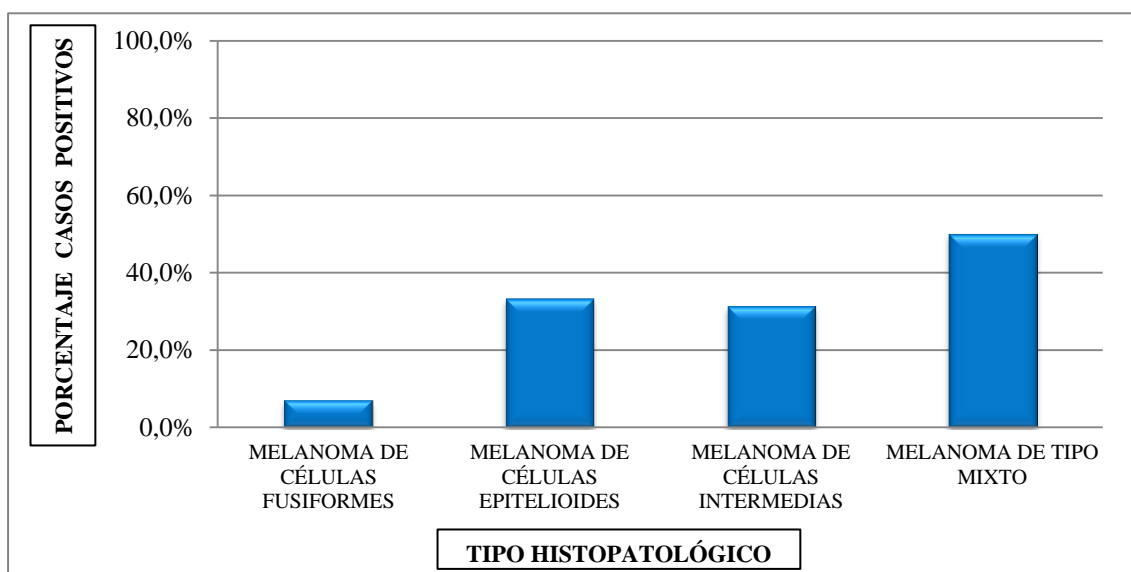


Figura 107. Relación entre el tipo histopatológico y monosomía 3.

5.3.- MONOSOMÍA 3 Y OTROS RASGOS HISTOPATOLÓGICOS

En nuestra serie se constató una asociación estadísticamente significativa ($p=0,027$) entre la afectación del cuerpo ciliar y la presencia de monosomía 3. El 55% de los melanomas con esta alteración cromosómica presentaron afectación del cuerpo ciliar.

En nuestro estudio existieron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o no de monosomía 3 y el número de mitosis/40 CGA ($p=0,008$). Los melanomas que presentaron la monosomía 3 tuvieron una media de 15,90 mitosis/40 CGA con una desviación estándar de 15,67 y los melanomas que no presentaron la delección cromosómica 3 una media de 7,5 mitosis/40 CGA con una desviación estándar de 10,35.

Atendiendo a los tres patrones de crecimiento que pueden presentar los melanomas del tracto uveal (focal, difuso plano o difuso en anillo) se observó que los melanomas con un patrón de crecimiento difuso plano se asociaron con mayor frecuencia a la monosomía 3 mientras que aquellos con un patrón focal no se asociaron habitualmente con la presencia de esta alteración cromosómica, aunque sin llegar a la significación estadística.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de monosomía 3 y el grado de pigmentación del tumor, la necrosis, la invasión vascular, la invasión del nervio óptico y la afectación escleral

5.4.- MONOSOMÍA 3 Y PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

En nuestro estudio se constató una asociación estadísticamente significativa, (aunque sólo ligera), entre la presencia o no de monosomía 3 y el número de células anti-CD68, ($p=0,053$). El 95% de los melanomas que presentaron la delección en el cromosoma 3 mostraron abundante número de células anti-CD68 acompañantes (2+/3+). Los melanomas con escaso número de células anti-CD68 no se asociaron, habitualmente, con la monosomía 3 (*Fig.108*).

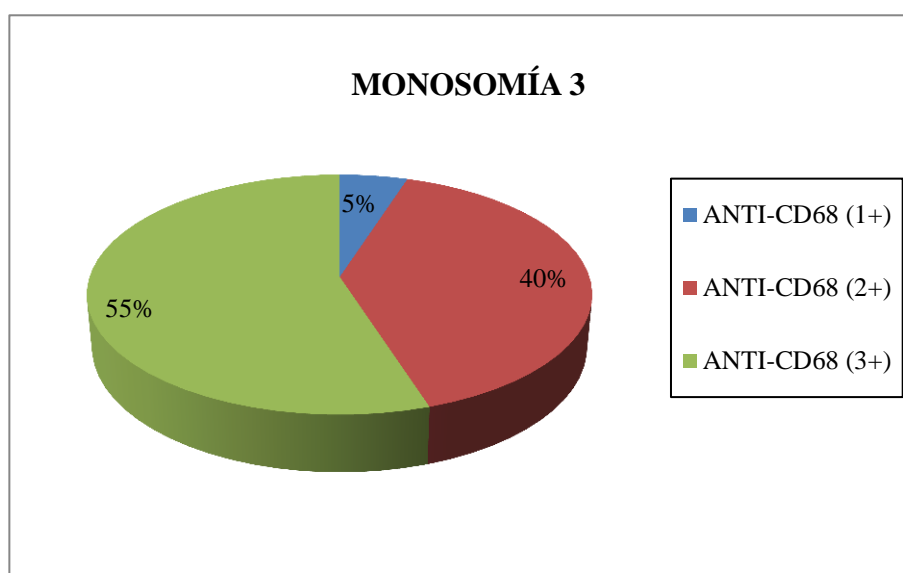


Figura 108. Clasificación de los casos con monosomía 3 en función del número de células anti-CD68 acompañantes.

El análisis de la presencia o no de monosomía 3 y el número de células acompañantes anti-CD163 mostró que el 100% de los casos con delección del cromosoma 3 presentaron una elevada proporción de células anti-CD163, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p=0,066$). Ningún melanoma de nuestra serie con escaso número de células anti-CD163 demostró la monosomía 3 (*Fig.109*).

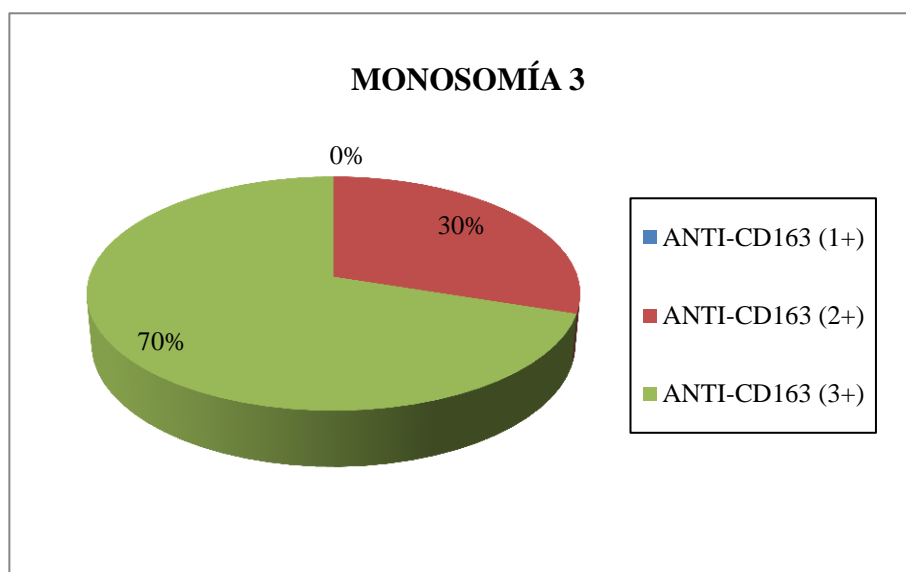


Figura 109. Clasificación de los casos con monosomía 3 en función del número de células anti-CD163 acompañantes.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de monosomía y la expresión de anti-CD3, anti-CD4/CD8, anti-Foxp3, anti-CD20 y anti-Ki67.

DISCUSIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

En nuestra serie de 79 pacientes afectados de melanoma uveal, existía un leve predominio por el sexo masculino (el 51,9% eran hombres y el 48,1% mujeres). Este resultado coincide con los de amplias series de melanomas del tracto uveal que ponen de manifiesto respecto al **sexo** que ambos están afectados de manera similar, con leve predominio en hombres.^{13,14,16,23-25,124} Sin embargo, en otras series españolas e israelíes publicadas son ligeramente más frecuentes en mujeres.^{12,18,26-28}

La mayor incidencia de melanoma uveal en nuestra serie correspondía a la 6^a-7^a década de la vida. El intervalo de **edad** de los 79 pacientes se encontraba entre los 14 y los 84 años, con una edad media de 58,5 años. Datos muy similares a los publicados en la mayor parte de las series donde la edad media se sitúa alrededor de los 55 años.^{12-14,17,18,20,23,28,30,122} Este tumor es infrecuente en niños y adolescentes.¹⁹⁻²¹ En nuestro estudio el paciente más joven tenía 14 años. Algunas series han descrito casos de melanoma uveal en niños de dos²² y tres años^{17,19,122} por lo que no debemos descartar el diagnóstico de estos tumores por la edad del paciente.

En cuanto a la **localización tumoral** en el tracto uveal, los melanomas de coroides (87,3%) predominaron en la serie estudiada sobre aquellos localizados en el cuerpo ciliar (11,4%) y en el iris (1,3%). En las series publicadas describen que este tumor afecta con mayor frecuencia a la coroides, en aproximadamente un 90% de los casos, seguido del cuerpo ciliar (7%) e iris (3%).^{9,28,35,39,40,61,82} Jensen,⁴⁰ en su revisión de melanomas uveales en Dinamarca, concluyó que el 97% de todos los melanomas de la úvea afectaban a la coroides y al cuerpo ciliar, mientras que únicamente el 3% afectaban al iris. Shields et al.³⁹ en una revisión de 8800 pacientes con melanoma uveal, determinaron que 8631 (98%) se originaban en la coroides o cuerpo ciliar, mientras que sólo 169 (2%) lo hacían en el iris.

Un aspecto no tratado en la mayoría de las publicaciones es cómo determinar la localización tumoral en aquellos casos en los que el melanoma compromete a varias partes o componentes del tracto uveal (iris-cuerpo ciliar, cuerpo ciliar-coroides o iris-

cuerpo ciliar-coroides). Cuando un melanoma de iris o de coroides invade el cuerpo ciliar, puede ser difícil de precisar la localización uveal inicial donde el tumor se originó.^{1,4,9-12,35} Algunos autores determinan la localización en iris, cuerpo ciliar o coroides según la localización del epicentro tumoral.^{17,20,98,105,122,124} Otros clasifican a los melanomas uveales según su localización en iris, cuerpo ciliar y coroides sin exponer los criterios utilizados en casos de afectación de dos o tres componentes uveales.^{16,19,27,30} Una minoría de autores consideran como localización inicial del tumor aquella que contenga más de las 2/3 partes de la masa tumoral,^{78,175} y otros, en cambio, aquella que contenga más del 50%.^{77,79} En nuestro estudio se consideró como localización inicial aquella que contenía más de las 2/3 partes de la masa tumoral. Los distintos criterios establecidos por cada uno de los autores pueden explicar las pequeñas diferencias observadas en cuanto la frecuencia de los melanomas de cuerpo ciliar e iris entre nuestro estudio y otras series publicadas (11,4% vs 7% en los melanomas de cuerpo ciliar y 1,3% vs 3% en los melanomas de iris).

La evaluación precisa del **tamaño tumoral** es crucial tanto en la selección del tratamiento como en su planificación (braquiterapia). El tamaño tumoral constituye una de las características clínicas más importantes para la estimación del pronóstico del melanoma uveal.^{10,11,30,87,92-94} Diener-West et al.⁹⁴ llevaron a cabo un metaanálisis de ocho publicaciones sobre el pronóstico del melanoma uveal tras la enucleación en base a su tamaño tumoral graduado como pequeño, mediano y grande. Debido a que se trataba de un metaanálisis, existían numerosas definiciones individuales para cada categoría de tamaño. Estos autores apoyan la conclusión de otros investigadores de que el tamaño tumoral en el momento de la enucleación es un factor pronóstico importante para los pacientes con melanoma uveal. Reconocen las dificultades para realizar este metaanálisis, destacando la población heterogénea, el tratamiento, diferentes métodos para notificar la mortalidad y sobre todo las diferentes definiciones del tamaño tumoral. El problema de utilizar el tamaño como característica pronóstica, sin embargo, se relaciona con la dificultad en la medición del tamaño de tumores con forma irregular.

Las dimensiones tumorales lineales se pueden estimar utilizando múltiples métodos de medición: oftalmoscopia, transiluminación, tomografía computarizada, ecografía, resonancia magnética y examen histopatológico.^{17,98,99} Se han utilizado varias

medidas para establecer el tamaño del tumor tales como la altura apical, las dimensiones basales, el espesor o grosor, la dimensión o diámetro basal mayor, la dimensión máxima tumoral,^{73,79,87} la longitud del arco del diámetro basal mayor,¹⁷ el volumen tumoral,⁹⁵ el espesor o grosor,⁹⁶ la longitud de la cuerda,⁹⁷ la dimensión tumoral máxima en contacto con la esclera^{95,134,157} y el área de la base tumoral.⁴⁰ Entre todas ellas el diámetro tumoral basal mayor es el indicador más ampliamente utilizado, pero existe mucha variación en cuanto a la forma en que se puede medir.¹⁰⁰ El diámetro basal puede ser subestimado si el tumor tiene márgenes difusos o si presenta un crecimiento anular alrededor del cuerpo ciliar.¹⁰¹ El diámetro basal mayor corresponde a la longitud de la cuerda.

En nuestra serie establecimos el tamaño del tumor midiendo la longitud del arco (máxima dimensión en contacto con la esclera) y la altura máxima. Así mismo para clasificar a los melanomas de coroides y cuerpo ciliar atendiendo al tamaño tumoral nos basamos en los criterios establecidos por el Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS).¹⁰⁰ Se observó que los tumores grandes eran los más frecuentes de la muestra, (50,0%) seguidos por los medianos (48,1%). Sólo uno de los tumores fue clasificado como pequeño (1,3%). Estos resultados contrastan con los previamente publicados por Frenkel et al.²⁸ en población israelí y Vicente et al.¹² (2013) en población española donde los tumores medianos y pequeños representan más de un 75% del total. La menor frecuencia de los tumores grandes, según estos autores podrían explicarse por las mejoras en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Las diferencias observadas en nuestra serie podrían deberse a la determinación del tamaño tumoral utilizando la longitud del arco en lugar de la longitud de la cuerda (que en la casi totalidad de las publicaciones viene referida como dimensión basal máxima). A ello se suma que la totalidad de nuestros casos son ojos enucleados (la enucleación se reserva para los tumores grandes) y las series referidas anteriormente están constituidas por melanomas cuya opción terapéutica más utilizada es la braquiterapia.

Chard et al.¹⁰⁰ observaron una buena correlación entre las medidas clínicas, ecográficas y patológicas en 51 ojos enucleados pero encontraron que las medidas histopatológicas tendían a ser menores que las otras dos medidas. Esta apreciación también fue señalada por Nicholson et al.¹⁰² en un estudio comparativo de las medidas

de la altura ecográfica e histopatológica en 53 pacientes sometidos a enucleación. Por término medio, la altura ecográfica era 2,2 mm mayor que la histopatológica, una diferencia que los autores atribuyeron a la reducción del tumor como consecuencia de la preparación y fijación del ojo en el laboratorio de Anatomía Patología. Se ha considerado, a veces, que la fijación, hidratación e inclusión en parafina puede reducir el tejido hasta un 33%.¹⁰⁰ Otros factores propuestos para justificar estas discrepancias incluyen la experiencia del clínico, la confusión entre la sangre y el tumor en el examen clínico, la sombra producida por tumores muy elevados durante el examen macroscópico, especialmente con la transiluminación,¹⁰³ y variaciones en el procesamiento histopatológico, diferencias en los métodos de sección, o cortes histopatológicos no representativos. Por el contrario, Augsburger et al.¹⁰¹ describieron que las medidas patológicas del tumor eran sistemáticamente mayor que la estimación clínica; los autores sugieren que la mala estimación clínica y la inadecuada orientación de los cortes macroscópicos podrían explicar la mayor parte de estas diferencias. También se han llevado a cabo correlaciones de las medidas del grosor tumoral mediante tomografía computarizada, ecografía y examen macroscópico. Según el COMS, las medidas ecográficas e histopatológicas de la altura apical coincidían ± 2 mm en el 90% de los casos, mientras que las medidas clínicas e histopatológicas del diámetro basal mayor lo hacían ± 2 mm en el 58% de los casos.¹⁰⁰

Algunos autores consideran el grosor o espesor tumoral como un buen predictor de supervivencia.¹⁷ Asimismo, el espesor tumoral es uno de los factores utilizados para estimar la supervivencia con el sistema de estadificación TNM del melanoma uveal.⁷⁷ En cambio, para otros autores, el espesor no parece ser un factor de riesgo independiente significativo cuando el diámetro tumoral y otros predictores se tienen en cuenta.⁹⁸ McLean et al.⁷³ concluyeron en su estudio de 3432 casos de melanoma uveal que el tamaño tumoral medido por su diámetro máximo se correlaciona mejor con datos de supervivencia que el grosor de la lesión. Además, el grosor está influenciado no sólo por el crecimiento neoplásico sino también por la inflamación del tejido si existe prolapso tumoral a través de la membrana de Bruch, y por el edema intersticial.

El tamaño tumoral se puede definir siguiendo tanto la clasificación TNM como los criterios del Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS).¹⁰⁰ Ambos diferencian entre melanomas pequeños, medianos y grandes en base a la dimensión basal mayor (mm) y a la altura máxima (mm).

Los radiólogos utilizan para determinar el tamaño tumoral tanto la longitud de la cuerda como la altura máxima. Nosotros proponemos incluir en el protocolo de estudio de los melanomas uveales la medida de la longitud del arco. Todas estas medidas (tanto las realizadas por el radiólogo como por el patólogo) pueden estar influenciadas por la posible deformidad del globo ocular, por el proceso de fijación o por tratarse de un melanoma con patrón de crecimiento difuso en anillo y sólo la estimación de las tres (longitud de la cuerda, altura máxima y longitud del arco) podrían salvar estas dificultades y unificar en el futuro este importante factor pronóstico.

Desde el punto de vista de la clasificación por **categoría tumoral**, de los 79 pacientes con melanoma uveal estudiados en nuestra serie, 10 (12,7%) fueron clasificados como categoría T1, 14 (17,7%) como categoría T2, 34 (43,0%) como categoría T3 y 21 (26,6%) como categoría T4. Nuestros resultados difieren de los publicados por distintos autores en 2013^{107,108} y 2015¹⁰⁹ donde las categorías tumorales más frecuentes son las T2 y T1 y la menos frecuente la T4.

En cuanto al **estadio** nuestra serie presentó un alto porcentaje de pacientes en estadio IV (36,7%) mientras que en las amplias series de 2013 y 2015 los pacientes en estadio IIA fueron los más frecuentes. Estas discrepancias pueden atribuirse a la diferente medición del tamaño tumoral en cada una de las series. Desde nuestro punto de vista, la medida de la longitud del arco es más anatómica, precisa y reproducible que el resto de medidas. Un tumor con una mayor superficie de contacto con la estructura anatómica por donde pueda infiltrar (en el caso del melanoma uveal, la esclera) tendrá más posibilidad de extenderse que otro con dicha superficie de contacto más reducida. La medida de la longitud del arco es una buena medida que enfrentar a la medida de la longitud de la cuerda y puede constituir un elemento sustancial que en algunos casos pueda modificar incluso el TNM del melanoma uveal y con ello el estadio tumoral.

En cuanto a la **evolución clínica** de los pacientes de nuestro estudio tras un tiempo de seguimiento medio de 50,1 meses (oscilando entre 3 y 115 meses), el 38% desarrollaron metástasis mientras que 62% finalizaron el estudio libre de enfermedad metastásica. El intervalo de meses en aparecer metástasis osciló entre los 3 y los 96 meses. Estos resultados son muy similares a los publicados, en los que el 40% de los pacientes con melanoma uveal desarrolla metástasis hepáticas.^{34,35} Se han descrito casos inusuales de melanomas uveales con metástasis clínicas más de 20 años después de la enucleación.³⁰

La localización más frecuente de metástasis en nuestra serie fue el hígado (86,7%) y el resto en localizaciones muy diversas. Estos resultados se ajustan a lo descrito en otras series que reflejan como la aparición de metástasis sigue constituyendo la principal causa de muerte en estos pacientes, siendo el hígado la localización más frecuente (90% de los casos).³²⁻³⁶ Otras localizaciones de metástasis fueron el pulmón (24%), el hueso (16%) y la piel o el tejido subcutáneo (11%), así como el páncreas, corazón, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal, riñones, cerebro, ovarios y tiroides. Estas metástasis extrahepáticas ocurrieron, coincidiendo con lo señalado en la bibliografía,³³ en asociación con las metástasis hepáticas. En nuestra serie el 10% de las metástasis se localizaron en ganglios linfáticos, resultados coincidentes con los publicados por el COMS.² Las metástasis ocurren por vía hematógena pero la extensión linfática inicial del melanoma uveal es rara, sin duda debido a la ausencia de linfáticos intraoculares. Se han descrito casos de metástasis en ganglios linfáticos regionales después de la extensión local a la conjuntiva, donde el melanoma alcanza los vasos linfáticos. En estos casos el tumor se extendió a la conjuntiva a través de los canales emisarios o la malla trabecular. Asimismo, los melanomas recurrentes tras la enucleación pueden invadir la conjuntiva que reviste la cavidad o implante orbitario y acceder a los linfáticos.³¹

Sólo dos de nuestros pacientes (2,5%) presentaron recidiva tumoral después de la enucleación, a los 17 y 36 meses respectivamente. Tras finalizar el seguimiento, 58 pacientes (73,4%) estaban vivos, nueve de ellos (15,5%) presentaban metástasis y 21 pacientes (26,6%) habían fallecido por melanoma en un período comprendido entre los 3 y 91 meses después de la intervención quirúrgica. El análisis del tiempo libre de

enfermedad proporcionó un valor de 76,3 meses de media y una supervivencia global media de 86,2 meses. Aunque el seguimiento de nuestros pacientes es más corto, las tasas de supervivencia, recidiva y aparición de metástasis son similares a lo comunicado en otras series.^{12,28,143}

2.- RASGOS HISTOPATOLÓGICOS

A diferencia de lo recomendado por distintos autores^{9,65,69,81,84} proponemos clasificar los melanomas uveales en cuatro **tipos histopatológicos**, atendiendo a rasgos citohistológicos que, con buenos cortes histológicos y una cuidadosa observación, son desde nuestro punto de vista, muy reproducibles. Estos tipos histopatológicos son los siguientes:

- ❖ Melanoma de células fusiformes: aquellos con más del 90% de células fusiformes, con un patrón cito-histológico fasciculado (haces gruesos, entrelazados), cohesivo, sincitial, citoplasma escaso aunque puede ser relativamente abundante, límite impreciso, núcleo alargado (morfología fusiforme), presencia de hendidura longitudinal o nucléolo.
- ❖ Melanoma de células epitelioides: aquellos con más del 90% de células epitelioides, patrón no fasciculado, pérdida de la cohesión o patrón falsamente cohesivo, células de forma redonda o poliédrica, citoplasma abundante y eosinófilo, límite celular preciso, membrana celular patente, núcleo redondo, central y grande, nucléolo central, eosinófilo y prominente.
- ❖ Melanoma de células intermedias: aquellos que no presentan un patrón claro ni de células fusiformes ni de células epitelioides, células fusiformes a las que les falta cohesión, con menos disposición sincitial (células individualizables), células poliédricas más cohesivas, no presentan hendiduras, nucléolos ocasionales, pleomorfismo con variabilidad en el tamaño, células gigantes, multinucleadas, irregularidad nuclear y citoplásmica.

- ❖ Melanoma de tipo mixto: aquellos con menos del 90% de células fusiformes y más del 10% de células epitelioides, presentando buena delimitación entre ambos componentes.

En nuestro trabajo se han definido con precisión los distintos tipos histopatológicos con sus características citohistológicas y se ha incluido el melanoma de células intermedias, al que consideremos una entidad clínico-patológica que se relaciona con factores de mal pronóstico, un hecho que no ha sido suficientemente destacado en la bibliografía. Defendemos por tanto la clasificación de los melanomas uveales en cuatro tipos histopatológicos dado su significado pronóstico, al tiempo que se establecen los rasgos cito-histológicos para su diagnóstico, que faltan en la mayoría de las publicaciones de referencia.

En 1931, Callender⁶⁶ propuso una clasificación de los melanomas uveales basada en los hallazgos citológicos e histopatológicos. Dividió las células del melanoma uveal en dos tipos citológicos principales: fusiforme (subtipo A y B) y epiteliode y clasificó en seis grupos a los melanomas uveales: tumores constituidos por células fusiformes tipo A y B, tumores compuestos por células epitelioides, tumores mixtos (en los que se advierte una mezcla variable de células fusiformes y epitelioides), tumores con un patrón fasciculado y tumores necróticos.

El mayor problema con la clasificación de Callender es el que representa su simplificación, por lo que el esquema es difícil de reproducir, incluso entre experimentados patólogos oculares. Callender no proporcionó los criterios para distinguir un melanoma de células fusiformes de tipo A de un nevus, ni los criterios claros para clasificar los tumores compuestos por una mezcla de células fusiformes A y B. Además no estableció claramente los criterios para diferenciar los tumores fusiformes y epitelioides puros de aquellos que consideró mixtos. McLean et al.⁷¹ recomendaron que los tipos de células fusiformes A y B se unieran y se denominaran melanomas de células fusiformes. Así, esta clasificación de Callender modificada propone tres tipos de tumores principales: tumores de células fusiformes, de células epitelioides y de tipo mixto.⁶⁹ Esta clasificación modificada de Callender es la seguida por la mayoría de los autores a pesar de no estar suficientemente precisados los criterios

para clasificar un melanoma uveal en los tres tipos histológicos. A veces puede resultar complicado decidir si una población de células pertenece a la categoría fusocelular o epitelioides. Esto ha generado la variabilidad intra-interobservador. La dificultad se debe a que las características citológicas de las células reflejan un espectro continuo que se resiste a la categorización artificial.

Aunque Callender reconoció sólo tres tipos de células en los melanomas uveales, en realidad existe un espectro desde células fusiformes de tipo A hasta células epitelioides bizarras anaplásicas. Dentro de este espectro están las células de forma fusiforme a las que les falta cohesión. Estas células pueden tener un nucléolo relativamente grande, eosinófilo, característico de las células epitelioides. Hay también células poliédricas que son cohesivas, con citoplasma fibrilar y nucléolo relativamente pequeño eosinófilo, característico de las células fusiformes de tipo B. ¿estas células deberían clasificarse meramente según su forma o en función a otras características?

McLean et al.⁷³ reconocen un tipo de célula epitelioides pequeña con menos citoplasma y núcleo más pequeño que la célula epitelioides clásica grande descrita por Callender. Estas células pequeñas tienen un gran nucléolo eosinófilo y carece de cohesividad, características típicas de las células epitelioides. El Collaborative Ocular Melanoma Study Group (COMS) definió una célula intermedia que presenta características tanto de una célula fusiforme B como de una célula epitelioides.⁸⁹ Otros tipos de células incluyen células epitelioides más pequeñas con un nucléolo basófilo marcado y células epitelioides multinucleadas y pleomórficas.

El melanoma de tipo mixto de Callender causa problemas adicionales. No hay acuerdo en cuanto a qué porcentaje de las células tienen que ser fusiformes y epitelioides para clasificar un tumor como del tipo mixto. ¿Se requiere menor número de células epitelioides si éstas son grandes y anaplásicas que si sólo se desvían mínimamente de las células fusiformes tipo B? En algunos estudios el diagnóstico de melanoma de células mixtas se reserva para tumores con al menos un 3-5% de células epitelioides.^{1,69} Yanoff et al.⁶⁷ clasifican un tumor como mixto si sólo una gran célula epitelioides inequívoca se observa en aproximadamente 5 CGA.

A causa de esta complejidad hay poco acuerdo entre patólogos cuando usan la clasificación de Callender. Los tumores de tipo epitelioides son raros porque casi todos los melanomas uveales contienen al menos unas pocas células con morfología fusiforme. Debido a la rareza y a la falta de consenso entre los patólogos oftálmicos respecto a la cantidad de componente de células fusiformes, es permisible en un tumor de tipo epitelioides la práctica actual del AFIP de designar como tipo mixto a todos los melanomas uveales que contienen células de tipo epitelioides cuando analizan los factores pronósticos.⁸⁸

El Collage of American Pathologist (CAP)⁷⁷ divide a los melanomas uveales en tres tipos: melanoma de célula fusiforme (con más del 90% de células fusiformes), melanoma de célula epitelioides (con más del 90% de células epitelioides) y melanoma de tipo mixto (con más del 10% de células epitelioides y menos del 90% de células fusiformes). A pesar de definir con precisión los criterios para clasificar los distintos melanomas no incluyen el melanoma constituido por células intermedias.

En nuestra serie el tipo histológico más frecuente (44,3%) fue el melanoma de células intermedias, seguido por el melanoma de células fusiformes (35,4%), el melanoma de tipo mixto (12,7%) y finalmente el melanoma de células epitelioides (7,6%). En las series publicadas el melanoma de tipo mixto es el más frecuente.^{68,70,73,89,145,225} Recordemos que la mayoría de autores sólo establecen tres tipos histológicos de melanoma uveal sin quedar precisados los criterios para inscribirlos en un tipo u otro. Existen publicaciones donde establecen dos grupos de melanomas: melanomas de células fusiformes y un segundo grupo constituido por los melanomas de tipo mixto y de células epitelioides, siendo éste último grupo el más frecuente.^{166,291,293,297} En nuestra serie a pesar de que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tipos histológicos y la supervivencia global, los pacientes con melanomas de células fusiformes presentaron una media de supervivencia global mayor que el resto de los pacientes con los otros tipos histológicos. Según la bibliografía revisada la tasa de mortalidad por melanoma de células fusiformes es menor que la del resto de los melanomas de células no fusiformes.^{69,81,105,226}

Sobre el **patrón de crecimiento** y sus criterios diagnósticos la bibliografía es muy confusa y varía según los autores. Nosotros proponemos los siguientes criterios de selección específicos para clasificar un melanoma uveal como difuso (plano): 1) melanoma primario de úvea; 2) afectación de al menos un cuarto de úvea observable en el plano de corte; y 3) patrón de crecimiento plano y altura que no exceda los 7 mm. Los melanomas clasificados con este tipo de patrón que cumplan los criterios anteriormente expuestos del patrón difuso pero afectan circunferencialmente a la úvea al menos 180° (6 o más horas de reloj) se clasifican como patrón difuso en anillo (“ring melanoma”). Es importante destacar que el melanoma difuso se puede presentar en la coroides, el cuerpo ciliar e iris y que el patrón difuso en anillo (“ring melanoma”) es un subtipo de melanoma difuso y como tal debe cumplir los criterios de crecimiento plano.

En nuestra serie se observa una mayor frecuencia (89,9%) del patrón de crecimiento focal (es decir, aquellos que muestran una masa sólida circunscrita), dato comparable con los publicados por Griewank et al.¹⁹⁰ El melanoma uveal difuso se define como el tumor uveal primario que muestra un patrón de crecimiento plano y cuyo espesor es igual o inferior al 20% de la dimensión basal máxima.^{9,45} Otros autores consideran patrón de crecimiento difuso cuando el tumor afecta al menos un cuarto de la úvea observable en el plano de corte y son menores de 7 mm de espesor máximo.⁴⁶ Font y posteriormente Shields et al.^{45,46} publicaron que el 3-5 % de los melanomas uveales incluidos en sus estudios eran de tipo difuso. En nuestra serie hemos obtenido resultados similares (el 5% mostraron un patrón de crecimiento difuso).

La definición del melanoma coroideo difuso varía según los autores, pero en general, es un melanoma coroideo primario con un patrón de crecimiento plano o mínimamente elevado y presenta una gran base en relación con su espesor.^{4,9,45,47,48} La definición ha variado poco desde las primeras publicaciones de melanoma coroideo difuso por Fuchs en 1882 y Mitvalsky en 1894. Parsons definió estos tumores como aquellos que infiltran amplias áreas de la úvea, produciendo un engrosamiento uniforme sin la formación de un tumor definido.⁴⁹

El melanoma de tipo difuso también ocurre en el cuerpo ciliar donde el tumor tiende a crecer en una configuración “en anillo”.⁵⁴ El término “melanoma en anillo” fue

utilizado por primera vez por Ewetzky en 1898 para describir un patrón de crecimiento inusual de melanoma uveal en el que el tumor se extendía circunferencialmente, afectando la totalidad del cuerpo ciliar e iris. Posteriormente, este término se adaptó para indicar la orientación circunferencial del crecimiento del melanoma en el ojo en general.⁵⁶ Parsons⁴⁹ especuló que este patrón de crecimiento representaba una variante del melanoma uveal difuso. Sólo una pequeña proporción de melanomas uveales difusos son tumores en anillo.⁵⁷ El melanoma en anillo es una variante rara de melanoma uveal (constituye aproximadamente el 0,3% de todos los melanomas uveales), que se caracteriza por un patrón de crecimiento circunferencial alrededor del ojo.^{56,58} Clásicamente, debería afectar a los tejidos uveales en un anillo completo pero en la práctica, el melanoma en anillo rara vez infiltra el tracto uveal tan extensamente. En nuestra serie el 5,1% de los casos presentaron un patrón de crecimiento difuso en anillo. Actualmente, este término se aplica al melanoma que afecte circunferencialmente a la úvea en al menos 180°.⁵⁶ Puede presentarse en la coroides, cuerpo ciliar, iris y ángulo de la cámara anterior, pero el cuerpo ciliar es su principal localización.^{56,57,59,60}

El melanoma uveal muestra diferentes **grados de pigmentación**, desde amelanóticos hasta tumores muy pigmentados. En nuestra serie los tumores con abundante grado de pigmentación fueron los más frecuentes (57%). Según el COMS¹⁴⁵ en su serie de 1527 globos oculares enucleados por melanoma uveal aproximadamente la mitad de los tumores presentaron mínimo o ningún grado de pigmentación mientras que alrededor del 30% mostraron un moderado grado de pigmento melánico. Otros autores publican datos similares a los del COMS.^{68,105} Esta disparidad puede deberse a la diferente graduación de la pigmentación establecida por los diferentes autores. En la mayoría de los casos la distribución de la melanina en el tumor no es uniforme. Este amplio rango de pigmentación puede variar considerablemente de célula a célula, de región a región, y de tumor a tumor. El pigmento melánico se puede localizar tanto en las células tumorales como en los macrófagos. En nuestro estudio se valoró la pigmentación global, es decir, incluyendo el pigmento de las células tumorales y de los macrófagos.

En nuestra serie la mayoría de los melanomas de células fusiformes y melanomas de células intermedias presentaron abundante grado de pigmentación

mientras que los melanomas de células epitelioides mostraron menor grado de pigmento. Nuestros datos difieren de los publicados por el COMS¹⁴⁵ que demostró una asociación entre el tamaño tumoral, el tipo de célula y el grado de pigmentación. Los tumores grandes y aquellos compuestos de células epitelioides mostraron con mayor frecuencia marcada pigmentación y macrófagos. Ninguno de los melanomas amelanóticos se clasificaron como epitelioides. Para otros autores este grado de pigmentación ampliamente variable en los melanomas uveales no se relaciona con el tipo celular.¹

En cuanto a la **necrosis**, en nuestra serie la mayor parte de los melanomas (68,4%) no presentaron necrosis tumoral significativa, resultados similares a los publicados por el COMS en tumores medianos. Sin embargo en tumores grandes aproximadamente la mitad mostraron $\leq 50\%$ de necrosis. Nuestros resultados reflejan que la mayoría de los melanomas de células intermedias presentaron amplias áreas de necrosis ($>50\%$) mientras que la mayoría de los melanomas de células fusiformes y ninguno de los melanomas de células epitelioides mostraron necrosis. Según el COMS¹⁴⁵ el grado de necrosis se relacionó con el tipo celular: los melanomas de células epitelioides presentaron mayor grado de necrosis que el melanoma de tipo mixto, siendo el melanoma de células fusiformes el que mostró menor necrosis. La disparidad de resultados referentes al melanoma de células epitelioides puede ser debida a nuestra diferente y novedosa clasificación de los melanomas uveales en cuatro tipos histológicos donde algunos melanomas de células epitelioides hayan sido clasificados como de células intermedias.

En cuanto a la valoración de la **actividad mitótica** en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, puede ser difícil reconocer las figuras mitóticas o diferenciarlas de ocasionales cuerpos apoptóticos, particularmente en tumores pigmentados o en áreas de necrosis. En el anexo 3 proponemos un protocolo de despigmentación para valorar la actividad mitótica en tumores pigmentados. Sólo aquellas células que estén en mitosis inequívocamente se aceptarán para el recuento. Un exacto índice mitótico requiere un tiempo considerable y está influenciado por la experiencia y agilidad del patólogo que realiza el recuento. En la bibliografía existe falta de criterio en la evaluación de la actividad mitótica. El número de CGA contabilizados es variable (10, 20 ó 40 CGA) y algunos autores no especifican el objetivo

utilizado.^{135,179,204,291} En nuestra serie valoramos la actividad mitótica contabilizando el número de mitosis en 40 CGA consecutivos utilizando el objetivo de 40x. Otros autores aconsejan cuando se evalúa el número de mitosis por CGA, dar el área del CGA y según otros, preferiblemente el número de mitosis por 1000 células.¹³⁸ Sin embargo, en determinadas publicaciones existen algunos problemas metodológicos importantes. En primer lugar, el uso de campos de gran aumento sin especificar introduce una notable variabilidad subjetiva y confunde las comparaciones de resultados entre centros, ya que “los campos de gran aumento” son áreas diferentes en los distintos microscopios.¹³⁹ Segundo, muchas publicaciones no justifican el por qué se seleccionan 40 campos. Por último, no es frecuente que las publicaciones especifiquen donde deben ser evaluadas las figuras mitóticas en el tumor. El número de mitosis en un tumor varía dependiendo de si la evaluación se realiza en el centro o en la periferia del tumor.

En nuestra serie existía mucha variabilidad en la actividad mitótica (oscilando entre 0 y 64 mitosis/40 CGA) e incluso en las distintas áreas del tumor. Dada la enorme variabilidad dentro del tumor incidimos en la conveniencia de medir el número de mitosis en 40 CGA. El índice de mitosis se relacionó con nuestros cuatro tipos histológicos globalmente. Los melanomas de células intermedias presentaron mayor número de mitosis/40 CGA ($p=0,026$) que los melanomas de células fusiformes. Según McLean⁴ la actividad mitótica es generalmente mayor en los melanomas de células epitelioides que en los de células fusiformes.

La afectación del cuerpo ciliar modifica la estadificación TNM del melanoma uveal. Es primordial por ello, valorar dicha afectación examinando todos los cortes histológicos que de rutina deben incluir ambos cuerpos ciliares. Importante recordar que el cuerpo ciliar está constituido por dos zonas (la pars plicata y la pars plana) y ambas deben ser valoradas. El cuerpo ciliar se extiende posterolateralmente unos 6 mm desde la raíz del iris y el espón escleral (proyección con forma de cresta de la superficie interna de la esclerótica a la altura del limbo esclerocorneal) hasta la ora serrata. En la ora serrata, la retina neurosensorial se atenúa y se vuelve quística, y se continúa con el epitelio no pigmentado interno del cuerpo ciliar. El epitelio pigmentado de la retina se continúa como la capa epitelial pigmentada de la pars plana. La quistificación de la retina nos puede ayudar, por tanto, a determinar el límite de la pars plana.

En nuestra serie la afectación del cuerpo ciliar se observó en un 32,9% de los casos, resultado similar a los obtenidos por McLean et al.⁸⁸ en su serie de 664 casos de melanomas uveales. El 53% de nuestros pacientes con afectación del cuerpo ciliar presentaron metástasis y el 42% fallecieron. Varios estudios han demostrado que la afectación del cuerpo ciliar se asocia con un peor pronóstico de supervivencia.^{87,88} La explicación de esta correlación no está clara. Se ha sugerido para tratar de explicar esta asociación que si el melanoma uveal se origina cerca del cuerpo ciliar es poco probable que cause síntomas visuales antes de que el tumor alcance un tamaño considerable, y si es de coroides generalmente tiene que alcanzar un gran tamaño para llegar a afectar al cuerpo ciliar. En ambos casos, los tumores que afectan al cuerpo ciliar tienden a ser de mayor tamaño cuando son diagnosticados, y este factor afecta significativamente las tasas de mortalidad.¹⁰⁵ Rummelt et al.¹⁰⁶ publicaron que el peor pronóstico de los tumores con afectación del cuerpo ciliar podría explicarse en parte por la tendencia de estos tumores a presentar redes y asas microvasculares, que parecen estar asociados con la muerte relacionada con el melanoma. La presencia de una mayor vascularización también podría explicar el mayor tamaño de los melanomas del cuerpo ciliar. Para otros, el contacto con el músculo ciliar y su contracción facilitaría la extensión de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo.⁸⁷

Al igual que la afectación del cuerpo ciliar, la **extensión extraocular** del melanoma uveal modifica la estadificación TNM de este tumor. Destacamos la importancia de valorar dicha extensión tanto macroscópicamente como en todos los cortes histológicos y en caso de que exista realizar su medición. En general, los melanomas uveales utilizan las estructuras transesclerales tales como los vasos y nervios para alcanzar las estructuras extraoculares (por ejemplo, la episclera) en aquellos casos en los que el tumor crece alrededor de los vasos sanguíneos y/o nervios.

En nuestra serie el melanoma infiltraba y rebasaba la esclera en el 13,9% de los casos. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por autores ingleses, americanos y daneses.^{40,87,135,143} Se ha sugerido que la extensión extraocular es más probable cuando el tumor intraocular está avanzado y que se asocia con características histológicas de mayor malignidad (por ejemplo, célula de tipo epitelioides).¹⁴³ En nuestro estudio el melanoma de células intermedias presentó con

mayor frecuencia afectación intraescleral y rebasó la esclera. Varios estudios han demostrado que la extensión extraocular denota un peor pronóstico de supervivencia.^{30,143} Zografos sugirió que la extensión extraocular se correlacionaba con una reducción de la supervivencia sólo si la extensión tumoral transescleral ocurría a través de las venas vorticosas; sin embargo, en este estudio no se consideraron factores predictivos histológicos.¹³⁵

Para subsanar las deficiencias de la literatura publicada, Coupland et al.¹³⁵ investigaron la correlación entre las vías de extensión extraocular y otros factores predictivos en una gran serie de pacientes con datos clínicos, histológicos y citogenéticos detallados. Los principales hallazgos de este estudio fueron que la extensión extraocular más frecuente se llevaba a cabo a través de los canales de drenaje del acuoso, ocurriendo en el 15% de los tumores que afectaban al cuerpo ciliar o ángulo. La extensión extraocular se asociaba con el tamaño y localización tumoral. Encuentran una fuerte asociación entre la extensión extraocular y los tumores de células epitelioides. Todas las vías de extensión extraocular se correlacionaron de manera similar con la muerte metastásica. Este resultado difiere significativamente de las conclusiones de Zografos, que como hemos comentado previamente, publicó que sólo la extensión extraocular a través de las venas vorticosas predecían un aumento de la mortalidad metastásica. Actualmente, no está claro si la extensión extraocular contribuye al riesgo de metástasis o si sólo es un indicador de mayor malignidad tumoral.¹³⁶

En nuestra serie la **invasión vascular** fue muy infrecuente. Únicamente en dos casos (2,5%) se observó invasión a nivel de las venas vorticosas. Raoof et al.¹⁴⁴ encontraron afectación microscópica de las venas vorticosas en el 11,9% de los melanomas uveales y Coupland et al.¹³⁵ en el 18,5%. La invasión de las venas vorticosas se correlacionaba con características pronósticas adversas tales como el tamaño tumoral grande, las asas y redes de matriz extracelular, las alteraciones genéticas asociadas con peor pronóstico y las metástasis hepáticas.¹⁴⁴ La menor frecuencia de invasión vascular en nuestra serie podría explicarse por una inclusión insuficiente de estas estructuras vasculares. Recomendamos un tallado riguroso del globo ocular realizando un corte transversal en el punto de salida del canal escleral (a ras de la esclera) e incluir longitudinalmente las cuatro venas vorticosas, si es posible, para ser cortadas a distintos

niveles para maximizar la posibilidad de detectar invasión vascular por el tumor. Así mismo aconsejamos prestar más atención a los tejidos perioculares en los que se encuentran el resto de vasos sanguíneos e incluso incluirlos en un cassette aparte.

La invasión de las células tumorales en los vasos sanguíneos es esencial para las metástasis en el melanoma uveal. Sin embargo, hay sólo un número limitado de estudios referentes a la invasión vascular en el melanoma uveal.¹³⁵

Un reciente estudio realizado por Ly et al.¹⁶³ sobre 643 melanomas uveales demostró que la presencia de tumor intravascular se asociaba con un peor pronóstico. La presencia de invasión vascular se correlacionaba significativamente con el diámetro tumoral, la presencia de células no fusiformes y el crecimiento intraescleral. En nuestra serie los dos únicos casos de invasión vascular (venas vorticosas) se constataron en un melanoma de células intermedias y en otro de tipo mixto. Rao et al.¹⁴⁴ describen en su serie que el 65,5% de los melanomas con invasión de las venas vorticosas eran melanomas de tipo mixto.

En nuestra serie la **invasión del nervio óptico** fue infrecuente. En un 7,6% de los casos identificamos invasión del nervio óptico prelaminar y en un 1,3% de los casos la invasión fue postlaminar. La invasión del nervio óptico en el melanoma uveal no es tan frecuente como en el retinoblastoma. El melanoma uveal infiltra el nervio óptico en el 0,6% - 5% de los pacientes y se ha asociado con la presión intraocular alta, el tipo de célula no fusiforme, la localización yuxtapapilar y la ceguera.¹⁴⁵ En nuestro estudio el melanoma de células epitelioides se asoció con mayor frecuencia con la invasión postlaminar del nervio óptico mientras que el 50% de los melanomas que presentaron invasión prelaminar fueron melanomas de células intermedias. La invasión normalmente se limita al tejido nervioso anterior a la lámina cribosa, aunque se han publicado casos de extensión al quiasma óptico y cerebro.¹⁴⁶

Lindegaard et al.¹⁴⁶ llevaron a cabo un estudio en el que revisaron 157 casos de melanomas uveales con infiltración del nervio óptico. Estos autores llegaron a la conclusión de que la invasión del nervio óptico se asociaba con un peor pronóstico debido al tamaño tumoral grande y la alta tasa de recurrencia orbitaria (ya que la probabilidad de una extirpación total del tumor es menor si el tumor se extiende al

nervio óptico, sobre todo, sino se sospecha que pueda existir dicha invasión previamente a la enucleación).

Con el propósito de caracterizar a cada uno de los cuatro tipos histopatológicos que proponemos de melanoma uveal, estudiamos la **relación entre los cuatro tipos histológicos y las características clínicas y morfológicas**. El análisis de las características clínico patológicas de cada uno de los cuatro tipos histológicos refuerza su singularidad. Así el melanoma de células intermedias presentaba un mayor grado de pigmentación y amplias áreas de necrosis. El 44,4% de los melanomas localizados en el cuerpo ciliar y la mayor parte (75%) de los melanomas con patrón de crecimiento difuso en anillo correspondieron a este tipo histológico. El melanoma de células intermedias presentó con mayor frecuencia afectación intraescleral o rebasó la esclera (el 47,4% de los melanomas con afectación intraescleral y el 63,6% de los que rebasaron la esclera fueron melanomas de células intermedias). En cuanto a la invasión del nervio óptico, el 50% de los melanomas que presentaron invasión prelaminar fueron melanomas correspondientes a este tipo. El 48,6% de los pacientes con melanomas de células intermedias presentaron metastásis y el 31,4% fallecieron. Uno de los dos casos que mostraron recidiva así como invasión vascular pertenecía a este tipo histopatológico. Los melanomas de células intermedias presentaron mayor número de mitosis/40 CGA y mayor índice de proliferación (anti-Ki67) que los melanomas de células fusiformes. Karlsson et al.,¹⁷⁶ Al-Jamal et al.¹⁸⁰ y Chowers et al.¹⁷⁵ señalan que los melanomas de células epitelioides se asocian a un alto índice de proliferación anti-Ki67. Sin embargo, Karlsson et al.¹⁷⁶ obvian el problema de cuantificar este anticuerpo en tumores pigmentados (ni utilizan el cromógeno rojo ni emplean métodos para el blanqueamiento de melanina). Otros autores no encontraron asociación entre el índice de proliferación anti-Ki67 y el tipo histológico.¹⁷⁷

En nuestra serie la mayoría de los melanomas de células fusiformes presentaron abundante grado de pigmentación, un patrón de crecimiento focal y no mostraron recidiva tumoral, necrosis, invasión del nervio óptico, extensión extraescleral, ni invasión vascular. Se asoció con la ausencia de afectación del cuerpo ciliar ($p=0,021$) y fue el tipo histológico que menos metastatizó y produjo menor número de éxitos.

En nuestro estudio todos los casos de melanomas de células epitelioides se localizaron en la coroides y presentaron menor grado de pigmentación. En este tipo de melanoma no se observó necrosis, invasión vascular ni un patrón de crecimiento difuso (plano o en anillo). Sólo el 16,7% presentó afectación del cuerpo ciliar. El melanoma de células epitelioides se asoció con mayor frecuencia con la invasión postlaminar del nervio óptico aunque sin llegar a ser estadísticamente significativa. Lindegaard et al.¹⁴⁶ describen en su serie que la mayoría de los melanomas con invasión del nervio óptico prelaminar o postlaminar están constituidos por melanomas de células no fusiformes. Encuentran asociación entre la invasión del nervio óptico y los melanomas de tipo no fusiformes. El 50% de los melanomas de células epitelioides metastatizaron y el 50% de los pacientes con este tipo histológico fallecieron. De los dos casos que recidivaron uno fue de células epitelioides.

En nuestra serie el melanoma de tipo mixto se asoció con la afectación del cuerpo ciliar ($p=0,021$). Estos hallazgos son similares a los descritos por Rummelt et al.¹⁰⁶ en los que el 55,6% de los melanomas con afectación del cuerpo ciliar son de tipo mixto. En cuanto al grado de pigmentación el 50% de los melanomas de tipo mixto presentaron escaso pigmento y el otro 50% abundante. Se asoció con mayor frecuencia con la localización en el cuerpo ciliar y con un patrón de crecimiento difuso plano aunque sin ser estadísticamente significativo. Demerci et al.⁶³ obtienen que el 68% de los melanomas difusos de iris son melanomas de tipo mixto. Sin embargo, según el COMS¹⁴⁵ no existen diferencias significativas entre el patrón de crecimiento y los tipos celulares. Uno de los dos casos de melanoma en los que se observó invasión vascular fue de este tipo. La mayor parte no mostró invasión del nervio óptico pero presentó afectación intraescleral. El 50% de los melanomas de tipo mixto (al igual que los de células epitelioides) metastatizaron. Estos resultados son similares a los descritos por Affeldt et al.¹⁴² que señalan una tasa de metástasis significativamente más baja en los melanomas de células fusiformes que en los melanomas de tipo mixto y de células epitelioides. En nuestra serie el 40% de los pacientes con este tipo histológico fallecieron. Ninguno de los casos recidivó.

3.-PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MICRO-AMBIENTE INFLAMATORIO

3.1.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD68

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que los melanomas uveales contienen macrófagos, pero este tipo de célula infiltrante de tumor no se ha estudiado con gran detalle ni ha sido descrita como un componente importante y ubicuo del melanoma uveal.

En 1998 el COMS¹⁴⁵ publicó que el 89% de los 1526 melanomas enucleados presentaron ningún, mínimo o moderado número de macrófagos y el 11% de los tumores marcado número de macrófagos. Este estudio de las poblaciones macrofágicas se realizó utilizando el microscopio óptico. Un mayor número de macrófagos se relacionó con tumores de mayor tamaño así como con los tumores de células epitelioides. Además el número de macrófagos incrementaba con el grado de pigmentación y de necrosis. Sin embargo, dada la metodología empleada en este estudio, sin utilizar un marcador inmunohistoquímico para detectar la población macrofágica y obviando el problema de la despigmentación en tumores con abundante pigmento melánico, su significación es escasa.

En nuestro estudio, la mayoría de los melanomas uveales (78,5%) presentaron un número elevado de células acompañantes anti-CD68. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente publicado por Mäkitie et al.²⁹⁰ que describen en su serie de 139 melanomas uveales, realizando técnicas de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD68 y blanqueamiento de melanina con peróxido de hidrógeno, que un 83% de los melanomas muestran un moderado-intenso número de macrófagos. En 2004 Toivonen et al.²⁹¹ tras realizar el blanqueamiento con permanganato potásico describen en un 96% de los casos un número moderado-intenso de células anti-CD68. Maat et al.¹⁶⁶ cuantificaron mediante inmunohistoquímica (método de fosfatasa alcalina y cromógeno Fast Red) la densidad de la población macrofágica y obtuvieron que el 68% de los 50 casos de la serie mostraron un número moderado-intenso de macrófagos. Ly et

al.²⁹⁷ en 2010 obtuvieron que el 67,5% de los casos estudiados (37) mostraron un medio-alto número de macrófagos. Más recientemente (2011) Bronkhorst et al.²⁹³ determinaron la densidad de macrófagos en 43 melanomas uveales mediante inmunohistoquímica y utilizando como cromógeno el Fast Red. El número de células anti-CD68 positivas en el 67% de los casos fue graduado como moderado-intenso. Nuestro estudio confirma que la infiltración difusa de macrófagos anti-CD68 positivos es una característica de los melanomas uveales.

En nuestra serie el melanoma de células epitelioides se relacionó con un número muy abundante de población acompañante anti-CD68 positiva y el melanoma de células fusiformes con un escaso número, aunque sin llegar a ser una asociación estadísticamente significativa. El tipo histológico que proponemos como melanoma de células intermedias en un 91,4% de los casos mostró una expresión de anti-CD68 (2+/3+). Mäkitie et al.²⁹⁰ obtuvieron que el número de células anti-CD68 positivas se asociaba significativamente con la presencia de células epitelioides. Otros autores, en cambio, no han encontrado asociación entre el tipo histológico y la densidad de células anti-CD68 positivas.²⁹¹ Una posible explicación a estos resultados discordantes podría ser el hecho de que estos autores hayan empleado técnicas de inmunofluorescencia para cuantificar la población macrofágica. Respecto al grado de pigmentación obtuvimos que los tumores amelanóticos se asociaban con mayor frecuencia a un número de células anti-CD68 (3+) ($p=0,08$). Mäkitie et al.,²⁹⁰ sin embargo, encontraron que existía asociación entre un grado de la pigmentación intensa y mayor densidad de células anti-CD68. Esta discrepancia puede ser debida al empleo por estos autores de técnicas de blanqueamiento con peróxido de hidrógeno para valorar la inmunoeexpresión de anti-CD68 en tumores pigmentados.

El tipo predominante de célula anti-CD68 en nuestra serie fue el redondo frente al dendrítico, resultado que difiere del publicado por Mäkitie et al.²⁹⁰ y Toivonen et al.²⁹¹ En sus series el tipo predominante de célula fue el intermedio (definían tres tipos: redondo, intermedio y dendrítico). Nuestros resultados señalan que la expresión de anti-CD68 se asocia significativamente con el tipo predominante de estas células acompañantes. Los tumores que presentaron un escaso número de células anti-CD68 se asociaban con un predominio de hábito redondo, mientras que los melanomas con un

número muy abundante de células anti-CD68 se relacionaban con un predominio de células anti-CD68 de hábito dendrítico. Estos hallazgos están de acuerdo con lo publicado por Mäkitie et al.²⁹⁰

En nuestra serie el tipo de célula predominante anti-CD68 presentó asociación estadísticamente significativa con el grado de pigmentación tumoral. El tipo redondo se asoció con melanomas con abundante pigmentación y el tipo de hábito dendrítico con tumores amelanóticos o con escasa pigmentación. Resultados coincidentes con los de la serie de Mäkitie et al.²⁹⁰ Así mismo existió asociación entre el tipo de célula anti-CD68 y el patrón de distribución de estas células acompañantes ($p=0,001$). El tipo redondo se asoció con el patrón perivascular mientras que el tipo de hábito dendrítico con el patrón de células dispersas. Al estudiar la relación entre el tipo predominante de anti-CD68 y el índice de mitosis, obtuvimos que el tipo redondo presentó menor número de mitosis que el tipo de hábito dendrítico ($p=0,002$). En la bibliografía revisada no se establece relación entre estas variables.

En nuestra serie y coincidiendo con el trabajo de Mäkitie et al.²⁹⁰ la necrosis, la afectación del cuerpo ciliar y la afectación escleral no se asociaron significativamente con el número de células anti-CD68 aunque en nuestro estudio la necrosis fue más habitual y extensa en tumores con expresión elevada de anti-CD68, los melanomas con afectación del cuerpo ciliar presentaron con mayor frecuencia una expresión de anti-CD68 (2+/3+) y la mayoría de los melanomas que rebasaron la esclera presentaron elevado número de células anti-CD68. Bronkhorst et al.²⁹³ observaron asociación significativa entre la afectación del cuerpo ciliar y el número de células de anti-CD68.

En nuestro estudio se encontró que los tumores de categoría tumoral T1 o estadios iniciales (estadio I) se asociaban con una escasa población de células anti-CD68 y tumores de mayor categoría tumoral (T2 a T4) o estadios avanzados (estadio IV) lo hacían con un elevado número de población acompañante anti-CD68 aunque sin ser estadísticamente significativo. Bronkhorst et al.²⁹³ encontraron asociación estadísticamente significativa entre el estadio y el número de células anti-CD68.

En nuestra serie con respecto al sexo no se observaron diferencias estadísticamente significativas, datos coincidentes con lo publicado por Bronkhorst *et al.*²⁹³ En cambio, en la serie estudiada por Mäkitie *et al.*²⁹⁰ los melanomas de pacientes mujeres tuvieron significativamente más células inmunopositivas anti-CD68 que los melanomas en hombres.

En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de anti-CD68 con respecto a la edad, el número de mitosis o el índice de proliferación (Ki67), la localización del tumor, el patrón de crecimiento, la invasión vascular y la invasión del nervio óptico. Pero algunas observaciones aisladas podrían ser de interés. Aunque nuestro grupo de melanomas del cuerpo ciliar es pequeño todos ellos presentaron un elevado número de células anti-CD68 (+), al igual que los melanomas difusos planos, los dos únicos casos de invasión vascular y el único caso de melanoma uveal con invasión del nervio óptico postlaminar. La relación entre estas variables no consta en la bibliografía revisada.

En cuanto a la evolución de nuestros pacientes, los dos únicos casos que recidivaron y la mayoría de los que metastatizaron y fallecieron por melanoma mostraron un número elevado de anti-CD68 pero sin ser significativo. Mäkitie *et al.*²⁸⁸ encontraron que la mortalidad específica por melanoma se asociaba significativamente con el número de células inmunopositivas anti-CD68. Los tumores con pocas células inmunopositivas tenían mejor pronóstico que aquellos con moderado a alto número de células inmunopositivas.^{290,293} En nuestra serie en cuanto a la supervivencia no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de células con inmunotinción positiva para anti-CD68.

3.2.- EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-CD163

En humanos, los macrófagos M2 se caracterizan por una alta expresión de anti-CD163 y la mayoría de los macrófagos en el melanoma uveal presentan esta característica, es decir, el principal tipo de macrófago presente en el melanoma uveal es del tipo M2.²⁹²⁻²⁹⁵

No hay ningún estudio en la bibliografía revisada que investigue la relación de factores pronósticos de melanoma uveal con la expresión de anti-CD163 mediante técnicas de inmunohistoquímica. Los que existen han valorado la expresión de anti-CD163 por inmunofluorescencia (anti-CD163 sólo o anti-CD68 y CD163 juntos).²⁹³

En nuestra serie obtuvimos una estrecha relación directa entre el número de células acompañantes anti-CD68 y anti-CD163. Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente señalado por Bronkhorst et al.²⁹² y Ly et al.²⁹⁷ La mayoría de los melanomas uveales de nuestro estudio (83,5%) presentaron un elevado número de células acompañantes anti-CD163. El melanoma de células fusiformes se asoció con mayor frecuencia a una escasa población de células anti-CD163 mientras que el melanoma de células epitelioides se relacionó con un número muy abundante de población acompañante anti-CD163(+), aunque sin llegar a ser una asociación estadísticamente significativa. El tipo histológico que proponemos como melanomas de células intermedias en un 85,8% de los casos mostro una expresión de anti-CD163 (2+/3+). Bronkhorst et al.²⁹³ no encontraron asociación entre el tipo histológico y la expresión de anti-CD163.

En nuestra serie los tumores con abundante pigmento estaban asociados con mayor frecuencia a un número escaso de células anti-CD163, sin llegar a ser estadísticamente significativo. La necrosis fue más habitual y >50% en tumores con expresión de anti-CD163 (3+) y la mayoría de los melanomas uveales (81,8%) que rebasaron la esclera y aquellos con patrón de crecimiento difuso plano mostraron un elevado número de células anti-CD163 (+). La relación entre estas variables no consta en la bibliografía revisada.

Bronkhorst et al.²⁹³ observaron relación estadísticamente significativa entre la expresión de anti-CD163 y la afectación del cuerpo ciliar. En nuestra serie los melanomas con afectación del cuerpo ciliar presentaron con mayor frecuencia una expresión de anti-CD163 (2+/3+) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Con respecto a la supervivencia no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos establecidos de células con inmunotinción positiva para anti-CD163.

Los tumores en estadios iniciales (estadio I) se asociaron con más frecuencia a un menor número de células anti-CD163 (+) mientras que aquellos tumores en estadios avanzados (estadio IV) se asociaron a un elevado número de células anti-CD163 (+) aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. Esta falta de asociación entre el estadio y expresión de anti-CD163 también fue observada por Bronkhorst *et al.*²⁹³ En cuanto al sexo no se observaron asociación significativa en nuestra serie, resultados coincidentes con los publicados por Bronkhorst *et al.*²⁹³

En cuanto a la inmunoexpresión de anti-CD163 no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad, la localización tumoral, la invasión del nervio óptico, la categoría tumoral, la invasión vascular, la recidiva, las metástasis, el número de mitosis/40 CGA y el índice de proliferación (Ki67). Pero alguna observación aislada podría ser de interés ya que la mayor parte de los melanomas que metastatizaron y provocaron el éxitus presentaron un elevado número de células anti-CD163 positivas. No hay estudios que relacionen estas variables.

Numerosos estudios se han centrado en identificar el valor pronóstico de los macrófagos asociados a tumor (TAMs) en una amplia variedad de tumores sólidos. La mayoría de estos estudios sugieren que los TAMs favorecen el crecimiento tumoral y, por consiguiente, se asocian con un peor pronóstico. En un amplio espectro de carcinomas tales como los de mama, cérvix, vejiga, ovario, páncreas, endometrio, esófago, linfoma folicular y melanoma uveal, se ha demostrado que la presencia de un extenso infiltrado de TAMs se correlaciona con un peor pronóstico.^{233,253,254,266} En cambio, en otros tumores, como los de próstata, pulmón y cerebro hay estudios contradictorios respecto al papel de los TAMs en la supervivencia de estos pacientes.²⁶⁵

Esta aparente contradicción entre estudios de un mismo tipo de tumor puede reflejar diferencias en el número, grado, estadio y tamaño de los tumores incluidos en cada estudio. Además, en estos estudios se han utilizado una amplia variedad de métodos para evaluar el infiltrado de los TAMs.

Zhang *et al.*²⁶⁵ llevaron a cabo un reciente metaanálisis teniendo en cuenta los datos aportados de 55 estudios donde se evaluaron la correlación entre TAMs y supervivencia de pacientes con tumores sólidos. Estos autores concluyeron que la

presencia de macrófagos se asociaba con una supervivencia disminuida en el carcinoma de endometrio, vejiga urinaria, mama, ovario, estómago y cavidad oral. Por el contrario, un incremento en la densidad de TAMs aumentaba la supervivencia global en pacientes con carcinoma colorrectal.

Aunque el valor pronóstico de los TAMs en la supervivencia de pacientes con tumores sólidos sigue siendo controvertido,²⁶⁵ en general, teniendo en cuenta todos los estudios (independientemente del número de muestras y métodos empleados) más del 80% muestran una asociación significativa entre una mayor densidad de TAMs y un peor pronóstico, mientras que menos del 10% asocian el incremento de TAMs con un buen pronóstico.²⁵¹ Por lo tanto, una densidad de TAMs incrementada, generalmente, se asocia con una progresión tumoral avanzada y con metástasis.²⁶⁷

3.3.- EXPRESIÓN DE MARCADORES LINFOIDES

En nuestro estudio el 49.4% de los melanomas uveales presentó una población linfoide con inmunorreacción positiva para anti-CD3. Estos hallazgos son coincidentes con los señalados por otros autores²⁸⁹ y discordantes con otra serie que señala que en aproximadamente el 5-12% de los melanomas uveales, es posible identificar infiltración del tumor por linfocitos (esta valoración se realizó bajo microscopía óptica).²⁸²

En nuestra serie la mayoría de los melanomas de células fusiformes (64,3%) no presentaron células anti-CD3 positivas mientras que la mayor parte de los melanomas de células epitelioides y de células intermedias mostraron células anti-CD3 (1+/2+). (66,7% y 57,2% respectivamente). Khanh et al.²⁹⁵ y Bronkhorst et al.²⁸⁷ (que emplean técnica de inmunofluorescencia) señalan que los melanomas uveales con células epitelioides contienen significativamente más linfocitos CD3, CD4, CD8 y Foxp3 positivos que los melanomas de células fusiformes.

Nuestros resultados señalan que la expresión de anti-CD3 se asocia significativamente con el número de células acompañantes anti-CD68 ($p=0,001$), con el número de células anti-CD163 ($p=0,005$) y con el tipo de célula predominante anti-CD68. El tipo predominante de célula anti-CD68 redonda se asoció con la ausencia de

células anti-CD3 acompañante y el tipo de hábito dendrítico se relacionó con un abundante número de células anti-CD3 ($p=0,001$). Bronkhorst et al.²⁸⁷ señalan la asociación entre linfocitos CD3, CD4, CD8 y Foxp3 positivos y el número de células acompañantes anti-CD68 y anti-CD163.

En general, nuestros melanomas uveales tienen poca respuesta linfocitaria y no hay diferencias estadísticamente significativas en las distintas subpoblaciones linfocitarias anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3 y anti-CD20 independientemente del tipo histológico y del número de células anti-CD68 y anti-CD163. La inmunoexpresión positiva de anti-Foxp3 se observó en el 30,8% de nuestros casos estudiados. Mougiakakos et al.²⁸⁷ concluyen que el 24% de los melanomas presentan expresión de anti-Foxp3 mientras que Lagouros et al.²⁸⁹ señalan que los linfocitos Foxp3 son infrecuentes en el melanoma uveal, sólo el 11,9 % de los casos (5 de 42) expresaron inmunorreacción positiva para anti-Foxp3.

Los TILs son linfocitos localizados en los infiltrados inflamatorios presentes en los islotes tumorales y en el estroma peritumoral de los tumores sólidos. Se piensa que representan un importante componente de la respuesta inmune del huésped al tumor. La evaluación del significado pronóstico de los TILs en otros tumores malignos ha puesto de manifiesto que el aumento del número de TILs se asocia a un mejor pronóstico.²⁸⁶ Varias publicaciones han estudiado la densidad y la composición de los linfocitos intratumorales en el melanoma uveal.^{141,281-283} Estos estudios son contradictorios en lo que se refiere a su importancia pronóstica, reflejo de la metodología subjetiva y de la variabilidad del tamaño muestral empleados.

Aunque nosotros no hemos establecido la relación entre la expresión de anti-CD3 con la supervivencia existen algunos trabajos que han estudiado la asociación entre estas dos variables. En el mayor estudio hasta la fecha, el llevado a cabo por de la Cruz et al.,¹⁴¹ se relacionó el número de TILs con la supervivencia de los pacientes en 1078 casos de melanomas uveales del AFIP: 134 tumores (12,4%) contenían 100 o más TILs/20 CGA (400x) y se identificaron como “con un elevado número de linfocitos”; un porcentaje similar de casos tenía menos de 100 TILs/20 CGA (400x) y constituyeron el grupo “con un bajo número de linfocitos”. Estos autores concluyeron que el aumento

del número de linfocitos por 20 CGA se asociaba significativamente con el descenso de la supervivencia. A este estudio se le han puesto varias objeciones, entre ellas el establecer un punto de corte bastante arbitrario de 100 linfocitos.

Whelchel et al.²⁸⁴ caracterizaron el perfil inmunohistoquímico de los TILs mediante marcadores para células B y T y concluyeron que existía un claro predominio de células T en la mayoría de los tumores y que la infiltración por linfocitos T se asociaba con la muerte debida a metástasis de melanoma uveal.

3.4.- EXPRESIÓN DE ANTI-KI67

En nuestro estudio la inmunoexpresión positiva para anti-Ki67 oscilaba entre el 1% y el 37%. Esta variabilidad se observa en la mayoría de las series publicadas.^{175,176,178,179} El índice de proliferación (anti-Ki67) puede variar dependiendo de si la inmunotinción se valora en todo el tumor, en campos aleatorios o consecutivos, o “puntos calientes” del tumor así como el número de campos valorados. También influye el método de cálculo (automatizado o no) y la técnica inmunohistoquímica empleada con blanqueamiento de melanina o no.

En nuestra serie los melanomas de células intermedias presentaron mayor índice de proliferación (anti-Ki67) que los melanomas de células fusiformes. Karlsson et al.,¹⁷⁶ Al-Jamal et al.¹⁸⁰ y Chowers et al.¹⁷⁵ señalan que los melanomas de células epitelioides se asocian a un alto índice de proliferación anti-Ki67. Sin embargo, Karlsson et al.¹⁷⁶ obvian el problema de cuantificar este anticuerpo en tumores pigmentados (ni utilizan el cromógeno rojo ni emplean métodos para el blanqueamiento de melanina). Otros autores no encontraron asociación entre el índice de proliferación anti-Ki67 y el tipo histológico.¹⁷⁷

4.- ALTERACIÓN MOLECULAR: MONOSOMÍA 3

La presencia de monosomía 3 fue detectada en el 25,3% de los casos de nuestros 79 melanomas uveales. La presencia de dicha delección oscila entre el 12% y el 65% en

las series publicadas.^{166,195,197,204,209,211,293} Es evidente que este rango amplio en la frecuencia de monosomía 3 se debe a la existencia de varios factores que influyen los resultados de la FISH. La monosomía del cromosoma 3 es la alteración cromosómica no aleatoria más frecuente en el melanoma uveal. En nuestra serie la edad y sexo no se asocian con la presencia de monosomía 3. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado previamente.^{166,190,195,204,206}

En nuestro estudio se demostró que la presencia de monosomía 3 se asocia significativamente con el tipo histológico del melanoma uveal ($p=0.002$). Los melanomas que se asocian con esta alteración molecular son el melanoma de células intermedias, el de células epitelioides y el de tipo mixto. En general, los melanomas de células fusiformes no se asocian a la monosomía 3. El porcentaje de casos positivos en nuestra serie es muy similar entre el grupo histológico de los melanomas de células epitelioides (33,3%) y el de células intermedias (31,4%) y ligeramente inferior al observado en el grupo de los melanomas de tipo mixto (50%). La asociación significativa entre la monosomía 3 y el melanoma de células epitelioides es ampliamente señalada por muchos autores.^{166,190,195,197,204,206,293}

En nuestra serie los melanomas que presentan la delección del cromosoma 3 tienen mayor número de mitosis ($p=0.008$). Este hallazgo está de acuerdo con lo señalado previamente por Damato et al.²⁰⁴ y pone de relieve el importante valor del recuento del índice mitótico realizado por el patólogo y la importancia de una correcta técnica del blanqueamiento de melanina para la visualización de las figuras de mitosis en los tumores pigmentados.

Nuestros resultados señalan que la presencia de monosomía 3 se asocia significativamente con la afectación del cuerpo ciliar ($p=0.027$). Estos hallazgos están de acuerdo con lo previamente publicado por la mayoría de autores^{166,190,195,204,293} y difieren de los publicados por Kilic et al.²⁰⁶ Por el contrario, la afectación del nervio óptico no mostró asociación con la presencia de monosomía 3. Resultados que concuerdan con lo señalado por Damato et al.²⁰⁴ La afectación escleral en nuestra serie no se relacionó con la presencia de la monosomía 3. Estos resultados están de acuerdo

con lo previamente señalado por Maat et al.¹⁶⁶ y Bronkhorst et al.¹⁹⁰ y difieren de lo señalado por Damato et al.²⁰⁴

En nuestra serie atendiendo a los tres patrones de crecimiento se observó que los melanomas con un patrón de crecimiento difuso plano se asociaron con mayor frecuencia a la monosomía 3 mientras que aquellos con un patrón focal no se asociaron habitualmente con la presencia de esta alteración cromosómica. En la bibliografía revisada no se relacionan estas variables.

En nuestro estudio la presencia de monosomía 3 no se relacionó con el tamaño tumoral. Resultados en consonancia con lo publicado por varios autores.^{166,190,195,206} Otros, en cambio, han señalado la asociación entre estas dos variables.^{198,204} Esta discrepancia puede ser debida, entre otras, a la diferente forma de medición del tamaño del melanoma uveal. En cuanto a la categoría tumoral y estadio en nuestro estudio no se asoció con la presencia de monosomía 3. En cambio, Bronkhorst et al.¹⁹³ en su serie destaca la asociación entre categoría tumoral y monosomía 3.

En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de monosomía 3 la aparición de metástasis y la supervivencia global. Estos hallazgos difieren completamente con lo publicado que destacan la disminución de la supervivencia en los pacientes con monosomía 3.^{166,190,195,198,206,214,293} Maat et al.¹⁹⁸ consideran la presencia de monosomía 3 como un marcador de enfermedad metastásica y de supervivencia.

En nuestro estudio la presencia de monosomía 3 se asoció con el número de células anti-CD68 ($p=0,053$). El 95% de los melanomas que presentaron la delección en el cromosoma 3 mostraron abundante número de células anti-CD68 acompañantes (2+/3+). Los melanomas con escaso número de células anti-CD68 no se asociaron, habitualmente, con la monosomía 3. Estos hallazgos son coincidentes con los publicados previamente por Maat et al.¹⁶² y Bronkhorst et al.²⁹³ que señalan en sus estudios que los melanomas uveales con monosomía 3 contenían significativamente más células anti-CD68 que aquellos tumores sin la alteración cromosómica.

En nuestra serie la presencia de monosomía 3 en los melanomas uveales se asoció con el número de células acompañantes anti-CD163. La totalidad de los casos con delección del cromosoma 3 presentaron una elevada proporción de células anti-CD163 ($p=0,066$).

La disparidad de resultados aparecidos en la bibliografía en cuanto a la presencia o no de monosomía 3 se deben probablemente a distintos factores entre los que destacamos: la heterogeneidad tumoral, el tamaño muestral, la localización y tamaño tumoral, la técnica del tejido muestreado (tejido fresco, biopsia aspiración con aguja fina, tejido fijado en formol e incluido en parafina), el número y el tipo de sonda utilizada, el número de células contabilizadas y el punto de corte para determinar la presencia de monosomía 3. No obstante, en nuestros resultados hay una asociación muchas veces significativa entre esta alteración molecular y algunos rasgos clínicopatológicos que caracterizan a los cuatro tipos histopatológicos de melanoma uveal que hemos definido en nuestro estudio.

5.- ASPECTOS METODOLÓGICOS

En general, los melanomas uveales son neoplasias con mucho pigmento melánico y esta circunstancia debe considerarse a la hora de plantear cualquier estudio inmunohistoquímico. Además los tumores con abundante pigmento plantean dificultad a la hora de cuantificar el número de mitosis.

En los melanomas uveales que presentan grado de pigmentación abundante los depósitos de melanina, presentes tanto en las células tumorales como en la población macrofágica, plantean serias dificultades para la valoración de los resultados inmunohistoquímicos empleando el kit de detección ultraView Universal DAB. El complejo formado se visualiza con un sustrato de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3, 3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) produce un precipitado de color marrón, en el sitio de unión del anticuerpo específico. En tumores pigmentados este precipitado de color marrón es difícil de distinguir del pigmento melánico.

La inmensa mayoría de los artículos publicados que realizan técnicas de inmunohistoquímicas emplean como técnica de blanqueamiento el peróxido de hidrógeno diluido al 3% con fosfato de hidrógeno disódico al 1% después de la realización de la inmunohistoquímica sin especificar detalladamente la metodología empleada y defienden que esta secuencia obvia cualquier problema de antigenicidad alterada que pudiera ocurrir si el blanqueamiento se realiza antes de la inmunotinción.^{127, 148,156,159,162,180,211,221,294} Otras publicaciones han realizado el blanqueamiento con permanganato potásico.^{158,160,179,291} Incluso el COMS realiza un estudio valorando el número de macrófagos sin realizar técnicas de inmunohistoquímica ni emplear por tanto método de blanqueamiento.¹⁴⁵ Otros autores^{176,182} realizan técnicas de inmunohistoquímica sin blanquear y otros emplean el blanqueamiento pero sin especificar qué método han utilizado.⁷⁸

Para superar estos inconvenientes procedimos a ensayar los distintos procedimientos de blanqueamiento de melanina descritos en la literatura.²⁹⁸⁻³⁰⁹ Con la **técnica de blanqueamiento con permanganato potásico** encontramos que la pérdida del tejido fue importante y el blanqueamiento fue incompleto. A pesar de realizar tras el blanqueamiento con permanganato potásico la técnica de inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB de Ventana Medical System según el protocolo establecido eliminando el horneado y el desparafinado, se observó una pérdida aún mayor del tejido y una disminución en la intensidad de la inmunotinción. Frangioni et al.²⁹⁸ ya critican los resultados obtenidos con el blanqueamiento con permanganato potásico. El tiempo requerido para eliminar la melanina completamente de las muestras varía según el grado de pigmentación inicial y además es difícil determinar cuál es este período máximo de tolerancia del tejido para conseguir el blanqueamiento óptimo. Kivelä³⁰¹ publica que el blanqueamiento con permanganato previo a la aplicación de los anticuerpos con frecuencia destruye los epitopos. Foss et al.³⁰² investigaron si el orden del blanqueamiento con permanganato antes o después de la recuperación antigénica era importante. Concluyeron que el blanqueamiento con permanganato puede no sólo interferir en la sensibilidad de la inmunotinción sino también alterar la especificidad del antígeno. Otros autores concluyen que el método de blanqueamiento con permanganato potásico es el método de elección previo a la realización de las técnicas

inmunohistoquímicas utilizando como cromógeno el DAB.^{299,304} Defienden que con este método el blanqueamiento se realiza en un tiempo razonable, con desprendimiento mínimo del tejido, no causa daño tisular con la consiguiente respuesta inmune alterada y no causa ningún cambio en la intensidad de la inmunotinción.²⁹⁹ McGovern et al.³⁰⁰ obtienen resultados óptimos utilizando como los autores anteriores el permanganato potásico previo a la realización de las técnicas inmunohistoquímicas. Apoyan que con esta técnica se elimina el pigmento manteniendo la integridad tisular y permitiendo una inmunotinción precisa e intensa. Nosotros pensamos al igual que otros autores que el método con permanganato es más rápido pero reduce la antigenicidad de algunos anticuerpos en el procedimiento inmunohistoquímico.^{300,302,305,307}

Con ninguno de los procedimientos de **blanqueamiento con H₂O₂** ensayados conseguimos una despigmentación totalmente completa y los resultados inmunohistoquímicos con el kit de detección ultraView Universal DAB no fueron óptimos en ninguno de ellos. Coincidimos con Alexander et al.³⁰² en que es difícil diferenciar entre la melanina blanqueada parcialmente y el producto de reacción del DAB.

Invirtiendo las técnicas, es decir, **realizando en primer lugar la técnica de inmunohistoquímica seguida de la técnica de blanqueamiento de melanina** (con permanganato potásico o H₂O₂) se consiguió eliminar pigmento melánico pero el precipitado marrón de la DAB se decoloraba. Estos resultados son coincidentes con los observados por Kivelä³⁰¹ y Alexander et al.²⁹⁹ Kivelä utiliza con buenos resultados el blanqueamiento con peróxido de hidrógeno diluido con fosfato disódico de hidrógeno tras la realización de la inmunohistoquímica evitando con ello la posibilidad de que se pudiera reducir o alterar la antigenicidad, ya que según este autor el DAB resiste el blanqueamiento con peróxido de hidrógeno. Momose et al.³⁰⁸ (2011) recomiendan el blanqueamiento utilizando peróxido de hidrógeno diluido al 3% con PB a 55°C durante dos horas tras la recuperación antigénica como método rápido y eficiente de blanqueamiento de pigmento melánico.

Más recientemente (2013) Liu et al.³⁰⁹ consideran como única desventaja del método de blanqueamiento con peróxido de hidrógeno el requerir 24 horas para

completar el blanqueamiento a temperatura ambiente y proponen mejorar la rapidez y eficacia de este procedimiento elevando la temperatura a 60°C y utilizando contenedores con alta velocidad de conducción.

Para la realización del estudio inmunohistoquímico, y de manera muy especial para poder evaluar con precisión la expresión del anti-Ki67 ensayamos las técnicas de blanqueamiento descritas en la literatura. Una vez realizado el blanqueamiento se procedió a la realización de la técnica inmunohistoquímica con el kit de detección ultraView Universal DAB con el anticuerpo anti-Ki67. La técnica no fue valorable pues la totalidad de las células presentaron inmunorreacción positiva para anti-Ki67. Este hallazgo no se describe en la bibliografía revisada. Li et al.³⁰⁵ en su estudio muestran que el blanqueamiento con peróxido de hidrógeno antes de la inmunohistoquímica es el método más apropiado como método de blanqueamiento ya que no afecta a la tinción con MIB1-Ki67 y la preservación del tejido, sugiriendo que el blanqueamiento con peróxido de hidrógeno es útil para el estudio de inmunorreacción para anti-Ki67 en lesiones pigmentadas.

Ante estos resultados recomendamos para el estudio de melanomas uveales pigmentados el protocolo de blanqueamiento de melanina (Anexo 3) para facilitar el recuento de mitosis así como la realización del estudio inmunohistoquímico (sin realizar el blanqueamiento) mediante el sistema de detección con fosfatasa alcalina (kit de detección ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red). Existen publicaciones que han usado este sistema.^{137,166,174,219,293}

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1^a. Los rasgos histopatológicos de los melanomas uveales permiten su clasificación en cuatro tipos distintos: de células fusiformes, de células epitelioides, de células intermedias y melanoma de tipo mixto.
- 2^a. El tipo de células intermedias, no incluido en las clasificaciones más ampliamente utilizadas, tiene -al igual que el resto- rasgos histopatológicos bien definidos y reproducibles.
- 3^a. Esta clasificación histopatológica tiene valor pronóstico: los melanomas de células fusiformes, frente a los otros tres tipos histopatológicos, se caracterizan de manera significativa por no afectar al cuerpo ciliar y tener menor índice de proliferación. Además, tienen un comportamiento clínico menos agresivo que el resto en lo que se refiere a la aparición de metástasis y el éxitus atribuible a la neoplasia.
- 4^a. El perfil inmunohistoquímico del microambiente tumoral y en particular de las poblaciones anti-CD68, anti-CD163 y anti-CD3 se deben incluir en el protocolo de estudio anatomopatológico del melanoma uveal porque contribuye a caracterizar a los distintos tipos histopatológicos y se relaciona con el pronóstico de la neoplasia.
- 5^a. El fenotipo inflamatorio que incluye un incremento de los macrófagos asociados a tumor se asocia con un peor pronóstico. La elevada expresión de anti-CD68 se asocia, aunque sin significación estadística, con otros factores adversos: así, es lo habitual en melanomas de células epitelioides, en aquellos que metastatizan, recidivan o llevan al éxitus, en aquellos que se presentan en estadios avanzados y en los que tienen necrosis, afectación del cuerpo ciliar, invasión vascular o infiltran la esclera.
- 6^a. Existe una estrecha relación directa entre la expresión de anti-CD68, anti-CD163 y anti-CD3 en los melanomas uveales. La mayoría de los macrófagos asociados a tumor en el melanoma del tracto uveal son del tipo M2.

- 7^a. La determinación de la expresión de anti-CD68 y anti-CD163 mediante inmunohistoquímica puede emplearse como método rápido y costoefectivo para identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar metástasis. Estos pacientes podrían tener un seguimiento más estrecho, recibir tratamiento adyuvante o podrían incluirse en ensayos clínicos orientados a prevenir el desarrollo de metástasis.
- 8^a. La monosomía 3 se asocia de manera estadísticamente significativa con el tipo histopatológico de melanoma uveal. Así, el 31,4% de los melanomas de células intermedias, el 33,3% de los de células epitelioides y el 50% de los de tipo mixto presentaron la monosomía 3 mientras que sólo el 7,1% de los melanomas de células fusiformes mostraron dicha delección cromosómica.
- 9^a. La monosomía 3 se asocia a un microambiente tumoral con numerosas células anti-CD68 y anti-CD163 positivas. Por ello, el estudio inmunohistoquímico de las poblaciones macrofágicas del ambiente inflamatorio del melanoma uveal ayuda a predecir dicha alteración molecular.
- 10^a. El diagnóstico anatomopatológico del melanoma uveal exige un tallado riguroso del globo ocular, la inclusión de toda la pieza quirúrgica y un estudio histopatológico, inmunohistoquímico y molecular sistematizado. Para alcanzar este objetivo proponemos, particularmente en centros de referencia como el nuestro, un protocolo sistemático de estudio clínico-patológico.
- 11^a. Las técnicas de blanqueamiento de la melanina en neoplasias muy pigmentadas son imprescindibles para facilitar el recuento de mitosis. Se han evaluado distintos procedimientos y proponemos un método ligeramente modificado con respecto a los publicados con el que se han obtenido excelentes resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Font RL, Croxato JO, Rao NA. Tumors of the uveal tract. In: Atlas of tumor pathology. Tumors of the eye and ocular adnexa. 4 ed. Washington DC: Arp Press; 2006. p. 41-81.
2. Newell FW. Anatomía y embriología. En: Oftalmología. Fundamentos y conceptos. 7 ed. Madrid: Mosby; 1993. p. 3-23.
3. Spaldon DJ, Hitchings RA. Anatomía normal. En: Atlas de Oftalmología clínica. 3 ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 258-76.
4. McLean IW, Burnier MN, Zimmerman LE, Jakobiec FA. Tumors of the uveal tract. In : Atlas of tumor pathology. Tumors of the eye and ocular adnexa. 3 ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1994. p. 155-213.
5. Geneser F. El ojo. En: Histología sobre bases biomoleculares. 3 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000 .p. 687-704.
6. Ross MH, Pawlina W. El ojo. En: Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 894-906.
7. Amat P, Bernal G, Bueno JL, Castañeyra A, Doñate F, Ferres R, et al. Pared del globo ocular. Túnicas intermedia y externa. Contenido del globo ocular. En: Amat P, Smith-Agreda JM, editors. Anatomía humana. Funcional y aplicativa. 5 ed. Barcelona: Expaxs; 2008. p. 1411-6.
8. Jovanovic P, Mihajlovic M, Djordjevic-Jocic J, Vlajkovic S, Cekic S, Stefanovic V. Ocular melanoma: an overview of the current status. Int J Clin Exp Pathol 2013;6:1230-44.
9. Mudhar HS, Parsons MA, Sisley K, Rundle P, Singh A, Rennie IG. A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma. Histopathology 2004; 45:1-12.
10. Laver NV, McLaughlin ME, Duker JS. Ocular melanoma. Arch Pathol Lab Med 2010;134:1178-84.
11. Papastefanou VP, Cohen VM. Uveal melanoma. J Skin Cancer 2011;2011:573974.doi:10.1155/2011/573974. Epub 2011 Jun 3.
12. Vicente N, Saornil MA, García-Álvarez C, Almaraz A, Alonso Martínez P, Frutos-Baraja JM, et al. Uveal melanoma: Clinical characteristics, treatment and survival in a series of 500 patients. Arch Soc Esp Oftalmol 2013;88:433-8.
13. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. Ophthalmology 2011;118:1881-5.
14. Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. Ophthalmology 2003;110: 956-61.
15. Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. Ophthalmol Clin North Am 2005;18:75-84.
16. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Biggeri A, Crocetti E, et al. Incidence of uveal melanoma in Europe. Ophthalmology 2007;114:2309-15.

17. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, Nagori S, Mashayekhi A, Lally DR, et al. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol* 2009;127:989-98.
18. Graell X, Caminal JM, Masuet C, Arias L, Rubio M, Pujol O, et al. Distribución por edades del melanoma de úvea y su relación con la supervivencia. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:343-8.
19. Singh AD, Shields CL, Shields JA, Sato T. Uveal melanoma in young patients. *Arch Ophthalmol* 2000;118:918-23.
20. Kaliki S, Shields CL, Mashayekhi A, Ganesh A, Furuta M, Shields JA. Influence of age on prognosis of young patients with uveal melanoma: a matched retrospective cohort study. *Eur J Ophthalmol* 2013;23:208-16.
21. Broadway D, Lang S, Harper J, Madanat F, Pritchard J, Tarawneh M, et al. Congenital malignant melanoma of the eye. *Cancer* 1991;67:2642-52.
22. Barr CC, McLean IW, Zimmerman LE. Uveal melanoma in children and adolescents. *Arch Ophthalmol* 1981;99:2133-6.
23. Damato BE, Heimann H, Kalirai H, Coupland SE. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival. *JAMA Ophthalmol* 2014;132:605-13.
24. Andreoli MT, Mieler WF, Leiderman YI. Epidemiological trends in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2015;0;1-4.
25. Shields CL, Kaliki S, Cohen MN, Shields PW, Furuta M, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. *Eye (Lond)* 2015;29:1027-35.
26. Caminal JM, Ribes J, Clèries R, Ibáñez N, Arias L, Piulats JM, et al. Relative survival of patients with uveal melanoma managed in a single center. *Melanoma Res* 2012;22:271-7.
27. Zloto O, Pe'er J, Frenkel S. Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:652-6.
28. Frenkel S, Hendler K, Pe'er J. Uveal melanoma in Israel in the last two decades: characterization, treatment and prognosis. *Isr Med Assoc J* 2009;11:280-5.
29. Hu DN, Yu GP, McCormick SA, Schneider S, Finger PT. Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups. *Am J Ophthalmol* 2005;140:612-7.
30. Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4651-9.
31. Dithmar S, Diaz CE, Grossniklaus HE. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina* 2000;20:76-9.
32. Singh AD, Borden EC. Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol Clin North Am* 2005;18:143-50,ix.

33. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol* 2001;119(5):670-6.
34. Shields JA, Shields CL, Donoso LA. Management of posterior uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1991;36:161-95.
35. Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:549-53.
36. Gragoudas ES; Egan KM; Seddon JM; Glynn RJ; Walsh SM; Finn SM, et al. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology* 1991;98:383-9; discussion 390.
37. Singh AD, Shields CL, Shields JA, De Potter P. Bilateral primary uveal melanoma. Bad luck or bad genes? *Ophthalmology* 1996;103:256-62.
38. Hadden PW, Damato BE, McKay IC. Bilateral uveal melanoma: a series of four cases. *Eye* 2003;17:613-6.
39. Shields CL, Shields JA, Materin M, Gershenbaum E, Singh AD, Smith A. Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. *Ophthalmology* 2001;108:172-8.
40. Jensen OA. Malignant melanomas of the human uvea. Recent follow-up of cases in Denmark, 1943-1952. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1970;48:1113-28.
41. D'Hermes F. Aspects macroscopiques et histopronostiques du mélanome malin choroidien. *J Fr Ophtalmol* 2007; 30:99-107.
42. Hainsworth DP, Sommerville DN, Ranson NT, Todd KC, Gigantelli JW. Bruch's membrane abnormalities in dome-shaped and mushroom-shaped choroidal melanomas. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35:87-8.
43. Augsburger JJ, Damato BE, Bornfeld N. Uveal melanoma. In: Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology*. 3 ed. London: Mosby Elsevier; 2009. p. 895-905.
44. D'Hermes F. La macroscopie du melanoma du corps ciliaire et/ou de la choroïdie. *J Fr Ophtalmol* 2002;25:439-49.
45. Shields CL, Shields JA, De Potter P, Cater J, Tardio D, Barret J. Diffuse choroidal melanoma. Clinical features predictive of metastasis. *Arch Ophthalmol* 1996;114:956-64.
46. Font RL, Spaulding AG, Zimmerman LE. Diffuse malignant melanoma of the uveal tract: a clinicopathologic report of 54 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1968; 72:877-95.
47. Blanco-Rivera C, Castro J, Santiago P, Campos S. Diffuse uveal melanoma. A clinical case. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006;81:545-8.
48. Biswas J, Raghavendra R, Ratra V, Krishnakumar S, Gopal L, Shanmugam MP. Diffuse malignant melanoma of the choroid simulating metastatic tumour in the choroid. *Indian J Ophthalmol* 2000;48:137-40.

49. Parsons JH. Diffuse sarcomata of the uveal tract. *Arch Ophthalmol* 1904;33:101-12.
50. Reese AB, Howard GM. Flat uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1967;64:1021-8.
51. Dhupper M, Biswas J, Gopal L, Kumar SK, Khetan V. Clinicopathological correlation of choroidal melanoma in Indian population: A study of 113 cases. *Oman J Ophthalmol* 2012;5:42-5.
52. Hashmi F, Rojanaporn D, Kaliki S, Shields CL. Orange pigment sediment overlying small choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2012;130:937-9.
53. Shields CL, Furuta M, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, Dinh DH, et al. Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol* 2009;127:981-7.
54. Vásquez LM, Pavlin CJ, McGowan H, Simpson ER. Ring melanoma of the ciliary body: clinical and ultrasound biomicroscopic characteristics. *Can J Ophthalmol* 2008;43:229-33.
55. Manschot WA. Ring melanoma. *Arch Ophthalmol* 1964;71:625-32.
56. Demerci H, Shields CL, Shields JA, Honavar SG, Eagle RC Jr. Ring melanoma of the ciliary body: report on twenty-three patients. *Retina* 2002;22:698-706.
57. Fitzpatrick M, Augsburger JJ, Koreischi FM, Eagle RC Jr. Complete ring melanoma of the choroid. *Retina* 1996;16:228-31.
58. Simpson ER. Ciliary body melanoma: a special challenge. *Can J Ophthalmol* 2004;39:365-71.
59. Demerci H, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr, Honovar S. Ring melanoma of the anterior chamber angle: a report of fourteen cases. *Am J Ophthalmol* 2001;132:336-42.
60. Lee V, Cree IA, Hungerford JL. Ring melanoma -a rare cause of refractory glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1999;83:194-8.
61. Omulecki W, Pruszczyński M, Borowski J. Ring melanoma of the iris and ciliary body. *Br J Ophthalmol* 1985;69:514-8.
62. Henderson E, Margo CE. Iris melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:268-72.
63. Demerci H, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr, Honovar SG. Diffuse iris melanoma: a report of 25 cases. *Ophthalmology* 2002;109:1553-60.
64. Skalicky SE, Giblin M, Conway RM. Diffuse iris melanoma: Report of a case with review of the literature. *Clin Ophthalmol* 2007;1:339-42.
65. Brown HH. Diseases of the eye and ocular adnexa. In: Barnes L, editor. *Surgical pathology of the head and neck*. 3 ed. Nueva York: Informa Healthcare; 2009. p. 1151-1608.
66. Callender GR. Malignant melanotic tumors of the eye. A study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1931;36:131-42.
67. Yanoff M, Fine BS. Ocular melanotic tumors. In: *Ocular Pathology*. 4 ed. Florida: Mosby-Wolfe; 1996. p. 646-62.

68. Wilder HC, Paul EV. Malignant melanoma of the choroid and ciliary body: a study of the 2535 cases. *Mil Surg* 1951;109:370-8.
69. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* 1983;96:502-9.
70. Paul EV, Paarnell BL, Fraker M. Prognosis of malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Int Ophthalmol Clin* 1962;2:387-402.
71. McLean IW, Zimmerman LE, Evans RM. Reappraisal of Callender's spindle A type of malignant melanoma of choroid and ciliary body. *Am J Ophthalmol* 1978;86:557-64.
72. Gass JD. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanomas. The XXXIII Edwards Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1977;83:299-323.
73. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 1982;13:123-32.
74. Grossniklaus HE, Albert DM, Green WR, Conway BP, Hovland KR. Clear cell differentiation in choroidal melanoma. COMS report no. 8. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *Arch Ophthalmol* 1997;115:894-8.
75. Verdijsk RM, Koopmans AE, Kilic E, Paridaens D, de Klein A. Histopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic analysis of primary clear cell melanoma of the uvea. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:814-6.
76. Khalil MK. Balloon cell malignant melanoma of the choroid: ultrastructural studies. *Br J Ophthalmol* 1983;67:579-84.
77. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds: *AJCC Cancer Staging Manual* 7 ed. New York NY: Springer; 2010. p. 547-59.
78. Pe'er J, Stefani FH, Seregard S, Kivela T, Lommatzsch P, Prause JU, et al. Cell proliferation activity in posterior uveal melanoma after Ru-106 brachytherapy: an EORTC ocular oncology group study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1208-12.
79. Gündüz K, Shields CL, Shields JA, Cater J, Freire JE, Brady LW. Plaque radiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement. *Arch Ophthalmol* 1999;117:170-7.
80. Rones B, Zimmerman LE. The prognosis of primary tumors of the iris treated by iridectomy. *AMA Arch Ophthalmol* 1958;60:193-205.
81. Singh AD, Shields CL, Shields JA. Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2001;11:255-63.
82. Shields CL, Kalibi S, Shah SU, Luo W, Furuta M, Shields JA. Iris melanoma: features and prognosis in 317 children and adults. *J AAPOS* 2012;16:10-6.
83. Sisley K, Brand C, Parson MA, Maltby E, Rees RC, Rennie IG. Cytogenetics of iris melanomas: disparity with other uveal tract melanomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;101:128-33.

84. Davirdorf FH. The melanoma controversy. A comparison of choroidal, cutaneous, and iris melanoma. *Ophthalmol* 1981;25:373-7.
85. Sunba MS, Rahi AH, Morgan G. Tumors of the anterior uvea. I. Metastasizing malignant melanoma of the iris. *Arch Ophthalmol* 1980;98:82-5.
86. Geise LJ, Robertson DM. Iris melanomas. *Am J Ophthalmol* 1985;99:638-48.
87. Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, Robinson N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1894-9.
88. McLean IW, Ainbinder DJ, Gamel JW, McCurdy JB. Choroidal-ciliary body melanoma. A multivariate survival analysis of tumor location. *Ophthalmology* 1995;102:1060-4.
89. Eagle RC Jr. The pathology of ocular cancer. *Eye (Lond)* 2013;27:128-36.
90. Sisley K, Parsons MA, Garnham J, Potter AM, Curtis D, Rees RC, et al. Association of specific chromosome alterations with tumour phenotype in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer* 2000;82:330-8.
91. Schoenfield L. Uveal melanoma: a pathologist's perspective and review of translational developments. *Adv Anat Pathol* 2014;21:138-43.
92. Flocks M, Gerende JE, Zimmerman LE. The size and shape of malignant melanomas of the choroid and ciliary body in relation to prognosis and histologic characteristics. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1955;59:740-58.
93. Shammass HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-9.
94. Diener-West M, Hawkins BS, Markowitz JA, Schachat AP. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-years mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:245-50.
95. McLean MIW, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58.
96. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Shields JA. Diffuse versus nondiffuse small (≤ 3 MM thickness) choroidal melanoma: comparative analysis in 1,751 cases. The 2012 F. Phinzy Calhoun lecture. *Retina* 2013;33:1763-76.
97. Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;66:1596-600.
98. Damato B, Coupland SE. A reappraisal of the significance of largest basal diameter of posterior uveal melanoma. *Eye (Lond)* 2009;23:2152-62.
99. Damato B. Progress in the management of patients with uveal melanoma. The 2012 Ashton Lecture. *Eye (Lond)* 2012;26:1157-72.
100. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Comparison of clinical, echographic, and histopathological measurements from eyes with medium-sized choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS report No. 21. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1163-71.

101. Augsburger JJ, Gamel JW, Bailey RS Jr, Donoso LA, Gonder JR, Shields JA. Accuracy of clinical estimates of tumor dimensions. A clinical-pathologic correlation study of posterior uveal melanomas. *Retina* 1985;5:26-9.
102. Nicholson DH, Frazier-Byrne S, Chiu MT, Schiffman J, Hughes JR, Novinski EK. Echographic and histologic tumor height measurements in uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1985;100:454-7.
103. Folberg R, Gamel JW, Greenberg RA, Donoso RA, Naidis RM. Comparison of direct and microslide pathology measurements of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;86:1788-91.
104. Char DH, Kemnitz AE, Miller T, Crawford JB. Iris ring melanoma: fine needle biopsy. *Br J Ophthalmol* 2006;90:420-2.
105. Rashid AB, Grossniklaus HE. Clinical, pathological, and imaging features and biological markers of uveal melanoma. *Methods Mol Biol* 2014;1102:397-425.
106. Rummelt V, Folbert R, Woolson RF, Hwang T, Pe'er J. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 1995;102:844-51.
107. Shields CL, Kaliki S, Furata M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint on Cancer Classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients. *Ophthalmology* 2013;120:2066-71.
108. Kujala E, Damato B, Coupland SE, Desfardins L, Bechrakis NE, Grange JD, et al. Staging of ciliary body and choroidal melanomas based on anatomic extent. *J Clin Oncol* 2013;31:2825-31.
109. International validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. AJCC Ophthalmic Oncology Task Force. *JAMA Ophthalmol* 2015;133:376-83.
110. Kivela T, Kujala E. Prognostication in eye cancer: the latest tumor, node, metastasis classification and beyond. *Eye (Lond)* 2013;27:243-52.
111. Jager MJ, Desjardins L, Kivelä T, Damato BE (Eds). *Current concepts in uveal melanoma*. Basel: Karger; 2012.
112. Damato B. Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival? *Br J Cancer* 2010;103:285-90.
113. Zimmerman LE, McLean IW. An evaluation of enucleation in the management of uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1979;87:741-60.
114. Seigel D, Myers M, Ferris F 3rd, Steinhorn SC. Survival rates after enucleation of eyes with malignant melanoma. *Am J Ophthalmol* 1979;87:761-5.
115. Augsburger JJ, Gamel JW, Shields JA. Cobalt plaque radiotherapy versus enucleation for posterior uveal melanoma: comparison of survival by prognostic index groups. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1989;87:348-61.
116. Seddon JM, Gragoudas ES, Egan KM, Glynn RJ, Howard S, Fante RG, et al. Relative survival rates after alternative therapies for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1990;97:769-77.

117. Kroll S, Char DH, Quivey J, Castro J. A comparison of cause-specific melanoma mortality and all-cause mortality in survival analyses after radiation treatment for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1998;105:2035-45.
118. Design and methods of a clinical trial for a rare condition: The Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report No. 3. *Control Clin Trials* 1993;14:362-91.
119. Diener-West M, Earle JD, Fine SL, Hawkins BS, Moy CS, Reynolds SM, et al. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma, III: initial mortality findings. COMS report No.18. *Arch Ophthalmol* 2001;119:969-82.
120. Hawkins BS, Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma: IV. Ten-years mortality findings and prognostic factors. COMS report number 24. *Am J Ophthalmol* 2004;138:936-51.
121. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Biggeri A, Crocetti E, et al. Survival in patients with uveal melanoma in Europe. *Arch Ophthalmol* 2008;126:1413-8.
122. Shields CL, Kaliki S, Arepalli S, Atalay HT, Manjandavina FP, Pieretti G, et al. Uveal melanoma in children and teenagers. *Saudi J Ophthalmol* 2013;27:197–201.
123. Gamel JW, McCurdy JB; McLean IW. A comparison of prognostic covariates for uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1919-22.
124. Shields CL, Kaliki S, Furata M, Mashayekhi A, Shields JA. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina* 2012;32:1363-72.
125. Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:8076-80.
126. Holly EA, Aston DA, Ahn DK, Kristiansen JJ; Char DH. Uveal melanoma, hormonal and reproductive factors in women. *Cancer Res* 1991;51:1370-2.
127. Mäkitie T, Tarkkanen A, Kivelä T. Comparative immunohistochemical oestrogen receptor analysis in primary and metastatic uveal melanoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236:415-9.
128. Hartge P, Tucker MA, Shields JA, Augsburger J, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Case-control study of female hormones and eye melanoma. *Cancer Res* 1989;49:4622-5.
129. Marcus DM, Minkovitz JB, Wardwell SD, Albert DM. The value of nucleolar organizer regions in uveal melanoma. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1990;110:527-34.
130. Gamel JW, McLean IW, Greenberg RA, Zimmerman LE, Lichtenstein SJ. Computerized histologic assessment of malignant potential: a method for determining the prognosis of uveal melanoma. *Human Pathol* 1982;13:893-7.
131. Coleman K, Baak JP, van Diest PJ, Mullaney. Prognostic value of morphometric features and the Callender classification in uveal melanoma, *Ophthalmology* 1996;103:1634-41.

132. Seddon JM, Polivogianis L, Hsieh CC, Albert DM, Gamel JW, Gragoudas ES. Death from uveal melanoma. Number of epithelioid cells and inverse SD of nucleolar area as prognostic factors. *Arch Ophthalmol* 1987;105:801-6.
133. McLean IW, Sibug ME, Becker RL, McCurdy JB. Uveal melanoma: the importance of large nucleoli in predicting patient outcome –an automated image analysis study. *Cancer* 1997;79:982-8.
134. Al-Jamal RT, Mäkitie T, Kivelä T. Nucleolar diameter and microvascular factors as independent predictors of mortality from malignant melanoma of the choroid and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2381-9.
135. Coupland SE, Campbell I, Damato B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma. *Ophthalmology* 2008;115:1178-85.
136. Damato B, Eleuteri A, Taktak AF, Coupland SE. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:285-95.
137. Mooy CM, Luyten GP, de Jong PT, Luider TM, Stijnen T, van de Ham F et al. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 1995;147:1097-104.
138. Mooy CM, De Jong PT. Prognostic parameters in uveal melanoma: a review. *Surv Ophthalmol* 1996;41:215-28.
139. Sadler DW, Coghill SB. Histopathologists, malignancies, and undefined high-power fields. *Lancet* 1989;1:785-6.
140. McLean IW, Saraiva VS, Burnier MN Jr. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Can J Ophthalmol* 2004;39:343-50.
141. de la Cruz Po, Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;65:112-5.
142. Angi M, Damato B, Kalirai H, Dodson A, Taktak A, Coupland SE. Immunohistochemical assessment of mitotic count in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2011;89:e155-60.
143. Affeldt JC, Minckler DS, Azen SP, Yeh L. Prognosis in uveal melanoma with extrascleral extension. *Arch Ophthalmol* 1980;98:1975-9.
144. Raoof N, Rennie IG, Salvi SM, Sisley K, Caine A, Mudhar HS. What is the significance of vortex vein invasion in uveal melanoma? *Eye (Lond)* 2009;23:1661-7.
145. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no 6. *Am J Ophthalmol* 1998;125:745-66.
146. Lindegaard J, Isager P, Prause JU, Heegaard S. Optic invasion of uveal melanoma. *APMIS* 2007;115:1-16.
147. Lindegaard J, Isager P, Prause JU, Heegaard S. Optic nerve invasion of uveal melanoma: clinical characteristics and metastatic pattern. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3268-75.

148. Kivelä T, Summanen P. Retinoinvasive malignant melanoma of the uvea. *Br J Ophthalmol* 1997;81:691-7.
149. Folberg R, Pe'er J, Gruman LM; Woolson RF, Jeng G, Montague PR, et al. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary heman uveal melanoma: a matched case-control study. *Hum Pathol* 1992;23:1298-1305.
150. Kivelä T, Mäkitie T, Al-Jamal RT, Toivonen P. Microvascular and networks in uveal melanoma. *Can J Ophthalmol* 2004;39:409-21.
151. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156:361-81.
152. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-52.
153. Folberg R, Mehaffey M, Gardner LM, Meyer M, Rummelt V, Pe'er J. The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas. *Eye (Lond)* 1997;11:227-38.
154. Folberg R, Chen X, Boldt HC, Pe'er J, Brown CK, Woolson RF, et al. Microcirculation patterns other than loops and networks in choroidal and ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 2001;108:996-1001.
155. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J, et al. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmolgy* 1993;100:1389-98.
156. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:359-67.
157. McLean IW, Keefe KS, Burnier MN. Uveal melanoma. Comparison of the prognostic value of fibrovascular loops, mean of the ten largest nucleoli, cell type, and tumor size. *Ophthalmology* 1997;104:777-80.
158. Foss AJ, Alexander RA, Hungerford JL, Harris AL, Cree IA, Lightman S. Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1997;81:240-8.
159. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2471-80.
160. Foss AJ, Alexander RA, Jefferies LW, Hungerford JL, Harris AL, Lightman S. Microvessels count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res* 1996;56:2900-3.
161. Lane AM, Egan KM, Yang J, Saornil MA, Alroy J, Albert D, et al. An evaluation of tumour vascularity as a prognostic indicator in uveal melanoma. *Melanoma Res* 1997;7:237-42.

162. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, Pe'er J, Folberg R. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2533-9.
163. Ly LV, Odish OF, Wolff-Rouendaal Dd, Missotten GS, Luyten GP, Jager MJ. Intravascular presence of tumor cells as prognostic parameter in uveal melanoma: a 35-year survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:658-65.
164. Forrester JV, Xu H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol* 2012;3:338
165. Bronkhorst IH, Jager MJ. Inflammation in uveal melanoma. *Eye (Lond)* 2013;27:217-23.
166. Maat W, Ly LV, Jordanova ES, de Wolff-Rouendaal D, Schalijs-Delfos NE, Jager MJ. Monosomy of chromosome 3 and an inflammatory phenotype occur together in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol* 2008;49:505-10.
167. Tuccari G, Giménez-Mas JA, Fedele F, Del-Agua C, Melcon B, Trombetta CJ, et al. The AgNOR quantity as prognostic parameter in choroidal melanomas: a standardised analysis. *Anal Cell Pathol* 1999;19:163-8.
168. Mooy C, Vissers K, Luyten G, Mulder A, Stijnen T, de Jong P, et al. DNA flow cytometry in uveal melanoma: the effect of pre-enucleation irradiation. *Br J Ophthalmol* 1995;79:174-7.
169. Meecham WJ, Char DH. DNA content abnormalities and prognosis in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1986;104:1626-9.
170. Karlsson M, Boerdy B, Carstensen J, Kågedal B, Wingren S. DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in patients with uveal melanomas. *Br J Cancer* 1995;71:177-81.
171. Elavathil LJ, LeRiche J, Rootman J, Gallagher RP, Phillips D. Prognostic value of DNA ploidy as assessed with flow cytometry in uveal melanoma. *Can J Ophthalmol* 1995;30:360-5.
172. Coleman K, Baak JP, van Diest P, Curran B, Mullaney J, Fenton M, et al. DNA ploidy status in 84 ocular melanomas: a study of DNA quantitation in ocular melanomas by flow cytometry and automatic and interactive static image analysis. *Hum Pathol* 1995;26:99-105.
173. Chowers I, Amer R, Pe'er J. The correlation among different immunostaining evaluation methods for the assessment of proliferative activity in uveal melanoma. *Curr Eye Res* 2002;25:369-72.
174. Gerdes J, Li L; Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
175. Chowers I, Folberg R, Livni N, Pe'er J. Comparison of microcirculation patterns and MIB-1 immunoreactivity in iris and posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 2001;108:367-71.

176. Karlsson M, Boervd B, Carstensen J, Frånlund B, Gustafsson B, Kågedal B et al. Correlation of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. *Eur J Cancer* 1996;32A(2):357-62.
177. Seregard S, Oskarsson M, Spångberg B. PC-10 as a predictor of prognosis after antigen retrieval in posterior uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1451-8.
178. Mooy CM, de Jong PT, Van der Kwast TH, Mulder PG, Jager MJ, Ruiters DJ. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma. The effect of pre-enucleation radiotherapy. *Ophthalmology* 1990;97:1275-80.
179. Pe'er J, Gnessin H, Shargal Y, Livni N. PC-10 immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. Enucleation versus enucleation postirradiation groups. *Ophthalmology* 1994;101:56-62.
180. Al-Jamal RT, Kivelä T. KI-67 immunopositivity in choroidal and ciliary body melanoma with respect to nucleolar diameter and other prognostic factors. *Curr Eye Res* 2006;31:57-67.
181. Blom DJ, Luyten GP, Mooy C, Kerkvliet S, Zwinderman AH, Jager MJ. Human leukocyte antigen class I expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma. *Invest ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1865-72.
182. Ericsson C, Seregard S, Bartolazzi A, Levitskaya E, Ferrone S, Kiessling R, et al. Association of HLA class I and class II antigen expression and mortality in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2153-6.
183. Jager MJ, Hurks HM, Levitskaya J, Kiessling R. HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Hum Immunol* 2002;63:444-51.
184. Maat W, Hassnoot GW, Claas FH, Schalijs-Delfos NE, Schreuder GM, Jager MJ. HLA class I and II genotype in uveal melanoma: relation to occurrence and prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3-6.
185. van Essen TH, Bronkhorst IH, Maat W, Verduyn W, Roelen DL, Luiten GP, et al. A comparison of HLA genotype with inflammation in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2640-6.
186. de Waard-Siebinga I, Hilders CG, Hansen BE, van Delft JL, Jager MJ. HLA expression and tumor-infiltrating immune cells in uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:34-42.
187. Griewank KG, Murali R. Pathology and genetics of uveal melanoma. *Pathology* 2013;45:18-27.
188. Maat W, Jordanova ES, van Zelder-Bhola SL, Barthen ER, Wessels HW, Schalijs-Delfos NE, et al. The heterogeneous distribution of monosomy 3 in uveal melanomas: implications for prognostication based on fine-needle aspiration biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:91-6.
189. Mensink HW, Paridaens D, de Klein A. Genetics of uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol* 2009;4:607-16.

190. Bronkhorst IH, Maat W, Jordanova ES, Kroes WG, Schalijs-Delfos NE, Luyten GP, et al. Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:1042-7.
191. Sisley K, Rennie IG, Cottam DW, Potter AM, Potter CW, Rees RC. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6, and 8. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;2:205-9.
192. Sisley K, Cottam DW, Rennie IG, Parsons MA, Potter AM, Potter CW, et al. Non-random abnormalities of chromosomes 3, 6, and 8 associated with posterior uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:197-200.
193. Horsthemke B, Prescher G, Bornfeld N, Becher R. Loss of chromosome 3 alleles and multiplication of chromosome 8 alleles in uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;4:217-21.
194. Prescher G, Bornfeld N, Horsthemke B, Becker R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor prognosis. *Lancet* 1992;339:691-2.
195. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jöckel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-5.
196. Sisley K, Rennie IG, Parsons MA, Jacques R, Hammond DW, Bell SM, et al. Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:22-8.
197. Scholes AG, Damato BE, Nunn J, Hiscott P, Grierson I, Field JK. Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1008-11.
198. van den Bosch T, van Beek JG, Vaarwater J, Verdijk RM, Naus NC, Paridaens D, et al. Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2668-74.
199. Nathan P, Cohen V, Coupland S, Curtis K, Damato B, Evans J, et al. Uveal Melanoma UK National Guidelines. *Eur J Cancer* 2015 Aug 13. pii: S0959-8049(15)00692-9. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.013. [Epub ahead of print]
200. Kaliki S, Shields CL, Shields JA. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol* 2015;63:93-102.
201. van den Bosch T, Kilic E, Paridaens D, de Klein A. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? *Dermatol Res Pract* 2010;2010:360136. doi: 10.1155/2010/360136. Epub 2010 Jun 6.
202. White VA, McNeil BK, Horsman DE. Acquired Homozygosity (Isodisomy) of Chromosome 3 in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;102:40-5.
203. Kilic E, van Gils W, Lodder E, Beverloo HB, van Til ME, Mooy CM, et al. Clinical and cytogenetic analysis in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3703-7.
204. Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology* 2007;114:1925-31.

205. Mensink HW, Vaarwater J, Kiliç E, Naus NC, Mooy N, Luyten G, et al. Chromosome 3 intratumor heterogeneity in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:500-4.
206. Kilic E, Naus NC, van Gils W, Klaver CC, van Til ME, Verbiest MM, et al. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2253-7.
207. Abdel-Rahman MH, Christopher BN, Faramawi MF, Sail-Ahmed K, Cole C, McFaddin A, et al. Frequency, molecular pathology and potential clinical significance of partial chromosome 3 aberrations in uveal melanoma. *Mod Pathol* 2011;24:954-62.
208. Damato B, Dopierala JA, Coupland SE. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res* 2010;16:6083-92.
209. Aronow M, Sun Y, Sauntharajah Y, Biscotti C, Tubbs R, Triozzi P, et al. Monosomy 3 by FISH in uveal melanoma: variability in techniques and results. *Surv Ophthalmol* 2012;57:463-73.
210. Turell ME, Tubbs RR; Biscotti CV, Singh AD. Uveal melanoma: prognostication. *Monogr Clin Cytol* 2012;21:55-60.
211. Werdich XQ, Jakobiec FA, Singh AD, Kim IK. A review of advanced genetic testing for clinical prognostication in uveal melanoma. *Semin Ophthalmol* 2013;28:361-71.
212. Singh AD, Aronow ME, Sun Y, Bebek G, Sauntharajah Y, Schoenfield LR, et al. Chromosome 3 status in uveal melanoma: a comparison of fluorescence in situ hybridization and single-nucleotide polymorphism array. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:3331-9.
213. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64:7205-9.
214. van Gils W, Lodder EM, Mensink HW, Kiliç E, Naus NC, Brüggewirth HT. Gene expression profiling in uveal melanoma: two regions on 3p related to prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4254-62.
215. Gill HS, Char DH. Uveal melanoma prognostication: from lesion size and cell type to molecular class. *Can J Ophthalmol* 2012;47:246-53.
216. Harbour JW. The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:171-81.
217. Onken MD, Worley LA, Char DH, Augsburger JJ, Correa ZM, Nudleman E, et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012;119:1596-603.
218. Nagarkatti-Gude N, Wang Y, Ali MJ, Honavar SG, Jager MJ, Chan CC. Genetics of primary intraocular tumors. *Ocul Immunol Inflamm* 2012;20:244-54.

219. Shah AA, Bourne TD, Murali R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. *Pathology* 2013;45:651-6.
220. Koopmans AE, Verdijk RM, Brouwer RW, van den Bosch TP, van den Berg MM, Vaarwater J, et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014 Mar 14;doi:10.1038/modpathol.2014.43 [Epub ahead of print].
221. Coupland SE, Anastassiou G, Stang A, Schilling H, Anagnostopoulos I, Bornfeld N, et al. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol* 2000;191:120-6.
222. Royds JA, Sharrard RM, Parsons MA, Lawry J, Rees R, Cottam D, et al. C-myc oncogene expression in ocular melanomas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;230:366-71.
223. Chana JS, Cree IA, Foss AJ, Hungerford JL, Wilson GD. The prognostic significance of c-myc oncogene expression in uveal melanoma. *Melanoma Res* 1998;8:139-44.
224. Rennie IG. The Ashton Lecture. Uveal melanoma: the past, the present and the future. *Eye (Lond)* 1997;11:255-64.
225. McLean IW. Prognostic features of uveal malignant melanoma. *Ophthalmol Clin North Am* 1995;8:143-53.
226. Isager P, Ehlers N, Overgaard J. Prognostic factors for survival after enucleation for choroidal and ciliary body melanomas. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:517-25.
227. Regan S, Judge HE, Gragoudas ES, Egan KM. Iris color as a prognostic factor in ocular melanoma. *Arch Ophthalmol* 1999;117:811-4.
228. Karnovsky ML. Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med* 1981; 304:1178-80.
229. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S9-17.
230. Fawcett DW. Bloom Fawcett. *Tratado de Histología*. 11 ed. Madrid: Interamericana Mc Graw-Hill; 1994. P. 153-7.
231. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549-55.
232. Hussein MR. Tumor-associated macrophages and melanoma tumorigenesis: integrating the complexity. *Int J Exp Pathol* 2006;87:163-76.
233. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:948098.doi:10.1155/2012/948098.Epub 2012 Jun 19
234. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 1980;303:622-6.

235. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
236. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:717-27.
237. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.
238. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-95.
239. Martínez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014 Mar 3;6:13 eCollection 2014
240. Dall'Asta M, Derlindati E, Ardigò D, Zavaroni I, Brighenti F, Del Rio D. Macrophage polarization: the answer to the diet/inflammation conundrum? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:387-92.
241. Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett* 2013;332:3-10.
242. Gordon S. Alternative activation of macrophage. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35.
243. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-86.
244. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005;23:344-6.
245. Jager MJ, Ly LV, El Filali M, Madigan MC. Macrophage in uveal melanoma and in experimental ocular tumor models: Friends or foes? *Prog Retin Eye Res* 2011;30:129-46.
246. Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine 2012;33:3792-802.
247. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18:349-55.
248. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883-99.
249. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-7.
250. Lee HW, Choi HJ, Ha SJ, Lee KT, Kwon YG. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 2013;1835:170-9.
251. Sica A, Saccani A, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1045-54.

252. De Palma M, Lewis C. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 2013;23:277-86.
253. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196:254-65.
254. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013;218:1402-10.
255. Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 2009;123:97-102.
256. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014;105:1-8.
257. Squadrito ML, De Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2011;32:123-45.
258. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008;267:204-15.
259. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 2004;40:1660-7.
260. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:11-8.
261. Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther* 2008;7:90-5.
262. Álvaro T, Noguera-Salvá R, Fariñas-Guerrero F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Rev Esp Patol* 2010;43:24-32.
263. Polette M, Nawrocky-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:179-86.
264. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009;324:1670-3.
265. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2012;7:e50946.
266. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:373-400.
267. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:71-8.
268. Facchetti F, Bertalot G, Grigolato GP. Kp1 (CD 68) staining of malignant melanomas. *Histopathology* 1991;19:141-5.

269. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27:3330-7.
270. Lan C, Huang X, Lin S, Huang H, Cai Q, Wan T, et al. Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2013;12:259-67.
271. Toivonen P, Kivelä T. Infiltrating macrophages in extratumoral tissues after brachytherapy of uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2012;90:341-9.
272. Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Exper Rev Mol Diagn* 2011;11:91-100.
273. Cook J, Hagemann T. Tumor-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:595-601.
274. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD 163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2004;122:794-801.
275. Nguyen TT, Schwartz EJ, West RB, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. *Am J Surg Pathol* 2005;29:617-24.
276. Onofre G, Kolácková M, Jankovicová K, Krejsek J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2009;52:57-61.
277. Shabo I, Stål O, Olsson H, Doré S, Svanvik J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* 2008;123:780-6.
278. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg Å, Oldenberg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7:e47045.
- 279.. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarization: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* 2013;8:e80908.
280. Woodward J, Sisley K, Reeves G, Nichols C, Parsons MA, Mudhar H, et al. Evidence of macrophage and lymphocyte, but not dendritic cell, infiltration in posterior uveal melanomas, whilst cultured uveal melanomas demonstrate pluripotency by expressing CD68 and CD163. *Int J Exp Pathol* 2004;85:35-43.
281. Bronkhorst IH, Jager MJ. Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* 2012;4:454-62.
282. Lang JR, Davidorf FH, Baba N. The prognostic significance of lymphocytic infiltration in malignant melanoma of the choroid. *Cancer* 1977;40:2388-94.
283. Durie FH, Campbel AM, Lee WR, Damato BE. Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2106-10.

284. Whelchel JC, Farah SE, McLean IW, Burnier MN. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2603-6.
285. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009;9:3.
286. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 2006;86:231-45.
287. Bronkhorst IH, Vu TH, Jordanova ES, Luyten GP, Burg SH, Jager MJ. Different subsets of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with macrophage influx and monosomy 3 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:5370-8.
288. Mougiakakos D, Johansson CC, Trocme E, All-Ericsson C, Economou MA, Larsson O, et al. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer* 2010;116:2224-33.
289. Lagouros E, Salomao D, Thorland E, Hodge DO, Vile R, Pulido JS. Infiltrative T regulatory cells in enucleated uveal melanoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2009;107:223-8.
290. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68 (+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1414-21.
291. Toivonen P, Mäkitie T, Kujala E, Kivelä T. Microcirculation and tumor-infiltrating macrophages in choroidal and ciliary body melanoma and corresponding metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1-6.
292. Herwig MC, Grossniklaus HE. Role of macrophages in uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol* 2011;6:405-7.
293. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:643-50.
294. Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, Höller T, Grossniklaus HE. M2/M1 ratio of tumor associated macrophages and PPAR-gamma expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles. *Exp Eye Res* 2013;107:52-8.
295. Vu TH, Bronkhorst IH, Versluis M, Marinkovic M, van Duinen SG, Vrolijk J, et al. Analysis of inflammatory cells in uveal melanoma after prior irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:360-9.
296. Ly LV, Baghat A, Versluis M, Jordanova ES, Luyten GP, van Rooijen N, et al. In aged mice, outgrowth of intraocular melanoma depends on proangiogenic M2-type macrophages. *J Immunol* 2010;185:3481-8.
297. Ly LV, Bronkhorst IH, van Beelen E, Vrolijk J, Taylor AW, Versluis M, et al. Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5445-51.
298. Frangioni G, Borgioli G. Rapid bleach for melanin. *Stain Technol* 1986;61:239-42.

299. Alexander RA, Hiscott PS, Hart RL, Grierson I. Effect of melanin bleaching on immunoperoxidase, with reference to ocular tissues and lesions. *Med Lab Sci* 1986;43:121-7.
300. McGovern J, Crocker J. The effect of melanin pigment removal on the peroxidase-antiperoxidase immunoperoxidase technic. *Am J Clin Pathol* 1987;88:480-3.
301. Kivelä T. Immunohistochemical staining followed by bleaching of melanin: a practical method for ophthalmic pathology. *Br J Biomed Sci* 1995;52:325-6.
302. Foss AJ, Alexander RA, Jefferies LW, Lightman S. Immunohistochemical techniques: the effect of melanin bleaching. *Br J Biomed Sci* 1995;52:22-5.
303. Alexander RA, Cree IA, Foss AJ. The immunoalkaline phosphatase technique in immunohistochemistry: the effect of permanganate-oxalate melanin bleaching upon four final reaction products. *Br J Biomed Sci* 1996;53:170-1.
304. Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J Dermatopathol* 1998;20:357-61.
305. Li LX, Crotty KA, Kril JJ, Palmer AA, McCarthy SW. Method of melanin bleaching in MIB1-Ki67 immunostaining of pigmented lesions: a quantitative evaluation in malignant melanomas. *Histochem J* 1999;31:237-40.
306. Orchard GE. Heavily pigmented melanocytic neoplasms: comparison of two melanin-bleaching techniques and subsequent immunohistochemical staining. *Br J Biomed Sci* 1999;56:188-93.
307. Orchard GE. Use of heat provides a fast and efficient way to undertake melanin bleaching with dilute hydrogen peroxide. *Br J Biomed Sci* 2007;64:89-91.
308. Momose M, Ota H, Hayama M. Re-evaluation of melanin bleaching using warm diluted hydrogen peroxide for histopathological analysis. *Pathol Int* 2011;61:345-50.
309. Liu CH, Lin CH, Tsai MJ, Chen WT, Chai CY, Huang YC, et al. Melanin bleaching with dilute hydrogen peroxide: a simple and rapid method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;21:275-9.

ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO Y MOLECULAR DEL MELANOMA UVEAL

A) CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-RADIOLÓGICAS

- LATERALIDAD

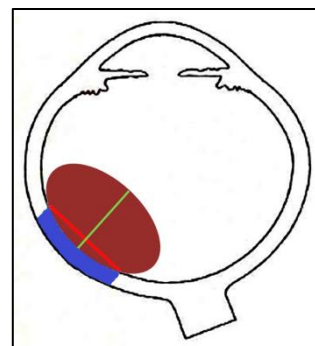
- ☐ Ojo derecho
- ☐ Ojo izquierdo
- ☐ No especificado

- LOCALIZACIÓN EN EL GLOBO OCULAR

- ☐ No puede determinarse
- ☐ Cuadrante súperotemporal
- ☐ Cuadrante súperonasal
- ☐ Cuadrante ínferotemporal
- ☐ Cuadrante ínferonasal

- TAMAÑO TUMORAL RADIOLOGICO

- ☐ No puede determinarse
- ☐ Longitud de la cuerda: _____ mm
- ☐ Altura máxima: _____ mm



En rojo: longitud de la cuerda
En verde: altura máxima
En azul: longitud del arco

▣ Observaciones: _____

B) PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

- ☐ Resección local
- ☐ Enucleación
- ☐ Exenteración
- ☐ Otros (especificar): _____
- ☐ No especificado

■ Observaciones: _____

C) ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

• DIMENSIONES DE LA PIEZA QUIRÚRGICA

— Para enucleación:

- ☐ Diámetro anteroposterior: _____ mm
- ☐ Diámetro horizontal : _____ mm
- ☐ Diámetro vertical: _____ mm
- ☐ Longitud del nervio óptico: _____ mm
- ☐ Diámetro del nervio óptico: _____ mm

— Para exenteración:

- ☐ Dimensiones anteroposterior, horizontal y vertical máximas:
_____ x _____ x _____ mm

• TAMAÑO TUMORAL

- ☐ No puede determinarse
- ☐ Longitud de la cuerda : _____ mm
- ☐ Altura máxima: _____ mm
- ☐ Longitud del arco: _____ mm

- LOCALIZACIÓN TUMORAL

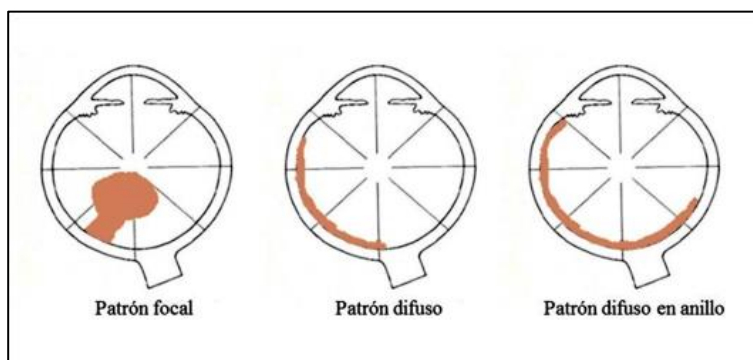
- ☐ No puede determinarse
- ☐ Coroides
- ☐ Cuerpo ciliar
- ☐ Iris
- ☐ Distancia del margen anterior del tumor al limbo: _____ mm
- ☐ Distancia del margen posterior del tumor al disco óptico: _____ mm

- AFECTACIÓN TUMORAL DE OTRAS ESTRUCTURAS OCULARES

- ☐ No puede determinarse
- ☐ Esclera
- ☐ Vena(s) vorticosa(s)
- ☐ Disco óptico
- ☐ Vítreo
- ☐ Coroides
- ☐ Cuerpo ciliar
- ☐ Iris
- ☐ Cristalino
- ☐ Cámara anterior
- ☐ Canal de Schlemm
- ☐ Nervio óptico
- ☐ Retina
- ☐ Córnea

- PATRÓN DE CRECIMIENTO

- ☐ No puede determinarse
- ☐ Focal
- ☐ Difuso plano
- ☐ Difuso en anillo



- TIPO HISTOLÓGICO

- ☐ Melanoma de células fusiformes (> 90% de células fusiformes)
- ☐ Melanoma de células epitelioides (> 90% de células epitelioides)
- ☐ Melanoma de células intermedias
- ☐ Melanoma de tipo mixto (> 10% de células epitelioides y < 90% de células fusiformes)

- AFECTACIÓN ESCLERAL

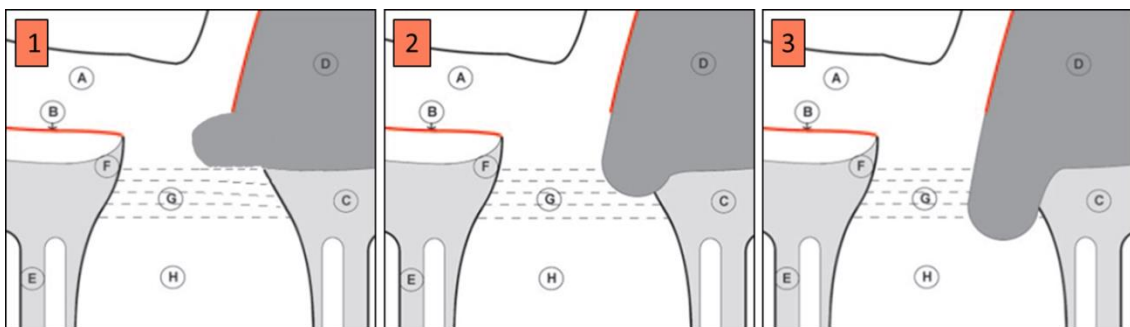
- ☐ No puede determinarse
- ☐ Ninguna
- ☐ Intraescleral
- ☐ Extraescleral: ☐ ≤ 5 mm ☐ > 5 mm

- AFECTACIÓN DEL CUERPO CILIAR

- ☐ No puede determinarse
- ☐ No
- ☐ Si

- AFECTACIÓN DEL NERVIO ÓPTICO

- ☐ No puede determinarse
- ☐ No
- ☐ Prelaminar
- ☐ Postlaminar



Afectación del nervio óptico. 1: invasión prelaminar; 2: invasión laminar; 3: invasión postlaminar. A) retina; B) membrana de Bruch; C) esclera; D) melanoma; E) duramadre; F) tejido limitante de Elschnig; G) lámina cribrosa; H) nervio óptico.

- MÁRGENES

- ☐ No pueden evaluarse
- ☐ Libres
- ☐ Otros márgenes afectos (especificar): _____

- OTROS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

- Índice mitótico: _____ /40 CGA
- Invasión vascular: ☐ No ☐ Si
- Grado de pigmentación: ☐ Ninguno ☐ Escaso ☐ Abundante
- Necrosis: ☐ No ☐ $\leq 50\%$ ☐ $> 50\%$
- Hemorragia: ☐ No ☐ Si

• pTNM: _____ ESTADIO: _____

📝 Observaciones: _____

D) PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO:

- Número de células anti-CD68 (+): ☐ Escaso ☐ Numeroso ☐ Muy abundante
- Número de células anti-CD163 (+): ☐ Escaso ☐ Numeroso ☐ Muy abundante
- Expresión de anti-CD3: ☐ Ninguna ☐ Poca ☐ Mucha
- Expresión anti-Ki67: _____ %

📝 Observaciones: _____

E) ESTUDIO MOLECULAR

- MONOSOMÍA 3: ☐ NO ☐ SI

📝 Observaciones: _____

TUMOR PRIMARIO	
TODOS LOS MELANOMAS UVEALES	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
MELANOMA DE COROIDES Y CUERPO CILIAR	
T1	Tamaño tumoral de categoría 1
T1a	Tamaño tumoral de categoría 1 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T1b	Tamaño tumoral de categoría 1 con afectación del cuerpo ciliar
T1c	Tamaño tumoral de categoría 1 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T1d	Tamaño tumoral de categoría 1 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T2	Tamaño tumoral de categoría 2
T2a	Tamaño tumoral de categoría 2 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T2b	Tamaño tumoral de categoría 2 con afectación del cuerpo ciliar
T2c	Tamaño tumoral de categoría 2 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T2d	Tamaño tumoral de categoría 2 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T3	Tamaño tumoral de categoría 3
T3a	Tamaño tumoral de categoría 3 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T3b	Tamaño tumoral de categoría 3 con afectación del cuerpo ciliar
T3c	Tamaño tumoral de categoría 3 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T3d	Tamaño tumoral de categoría 3 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro

T4	Tamaño tumoral de categoría 4
T4a	Tamaño tumoral de categoría 4 sin afectación del cuerpo ciliar ni extensión extraocular
T4b	Tamaño tumoral de categoría 4 con afectación del cuerpo ciliar
T4c	Tamaño tumoral de categoría 4 sin afectación del cuerpo ciliar y con extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T4d	Tamaño tumoral de categoría 4 con afectación del cuerpo ciliar y extensión extraocular \leq de 5 mm de diámetro
T4e	Cualquier tamaño tumoral con extensión extraocular $>$ de 5 mm de diámetro

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales

METÁSTASIS A DISTANCIA	
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis de mayor tamaño con diámetro \leq de 3 cm
M1b	Metástasis de mayor tamaño con diámetro entre 3,1-8 cm
M1c	Metástasis de mayor tamaño con diámetro \geq de 8 cm

ESTADIO ANATÓMICO/ GRUPOS PRONÓSTICOS			
ESTADIO	T	N	M
I	T1a	N0	M0
IIA	T1b-d	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIB	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIIA	T2c-d	N0	M0
	T3b-c	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIIB	T3d	N0	M0
	T4b-c	N0	M0
IIIC	T4d-e	N0	M0
IV	Cualquier T	N1	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1a-c

ANEXO 2

TALLADO DE LA PIEZA DE ENUCLEACIÓN OCULAR POR MELANOMA UVEAL

1.- FIJACIÓN:

- Volumen de fijación de al menos 60 ml de formol neutro tamponado al 10% durante al menos 24 horas antes del tallado.
- Otros autores recomiendan un volumen de fijación de al menos 10 veces el volumen de la pieza y un tiempo de fijación mínimo de 48 horas.
- El formol no debe ser inyectado en el globo ocular ni tampoco son necesarias para la correcta penetración del formol realizar incisiones o ventanas en el globo ocular.

2.- ORIENTACIÓN:

- Esencial para determinar la localización de una lesión intraocular.
- Confirmar la lateralidad de la pieza de enucleación ocular
- Los puntos de referencia anatómicos claves son los siguientes (*Fig.1*):
 - ❖ Arterias ciliares posteriores largas: A menudo se identifican como una línea azul-grisácea posterior en la esclera a cada lado del nervio óptico. Son dos y se sitúan a las 3 y 9 horarias. El vaso nasal generalmente es más prominente y podría utilizarse para identificar el lado nasal del ojo.
 - ❖ Músculo oblicuo superior: Tiene una fina inserción tendinosa en el polo superotemporal del globo ocular.

- ❖ Músculo oblicuo inferior: No tiene casi componente tendinoso, tiene una inserción muscular en el lado posterotemporal justo por debajo del plano horizontal y bajo la arteria ciliar larga temporal.
- ❖ Nervio óptico: Está más cerca del limbo nasal que del limbo temporal.
- ❖ Músculos rectos: Se insertan horizontal, inferior y superiormente.
- ❖ Córnea: Es mayor horizontalmente que verticalmente. Así, el eje mayor de la córnea nos indica el meridiano horizontal.

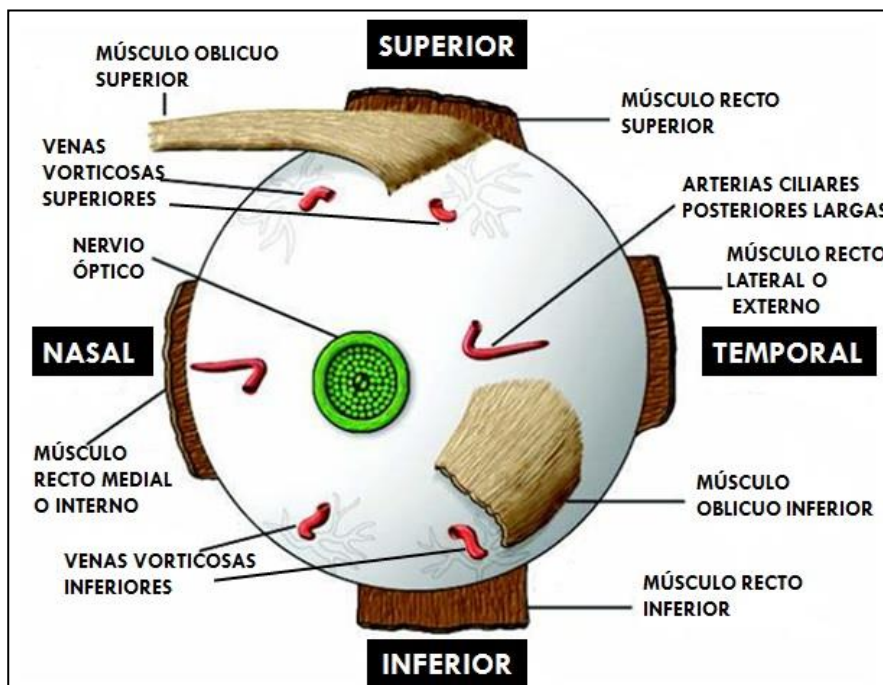


Figura 1. Visión posterior del globo ocular derecho.

- Al visualizar posteriormente el globo ocular con las arterias ciliares posteriores largas en el plano horizontal y la parte más alta del músculo oblicuo superior, el músculo oblicuo inferior se insertará a la derecha del nervio óptico en el ojo derecho y a la izquierda en el ojo izquierdo. Es pues la posición de este músculo con respecto al nervio óptico la que más ayuda a la orientación del globo ocular. Su inserción se localiza temporal al nervio óptico en la esclera y sus fibras se dirigen inferonasalmente desde su inserción.

3.- EXAMEN EXTERNO DEL GLOBO OCULAR:

- Medición de la pieza de enucleación en tres dimensiones:
 - ❖ Diámetro anteroposterior
 - ❖ Diámetro horizontal
 - ❖ Diámetro vertical
- Medición de los diámetros corneales (horizontal y vertical).
- Medición del nervio óptico: longitud y diámetro.
- Evaluar si el globo ocular está intacto, abierto, colapsado o distorsionado.
- Examinar las siguientes estructuras sistemáticamente: conjuntiva (normalmente se observa un ribete o borde alrededor de la córnea), pupila, córnea, iris, epiesclera/esclera (determinar si existe extensión extraescleral), nervio óptico, venas vorticosas).

4.- LA INFORMACIÓN CLÍNICA QUE DEBERÍA SE APORTADA PARA FACILITAR LA APERTURA DEL GLOBO OCULAR SERÍA:

- Lateralidad de la pieza de enucleación.
- Tamaño del tumor (*Fig. 2*):
 - ❖ Longitud de la cuerda (dimensión basal máxima)
 - ❖ Altura máxima

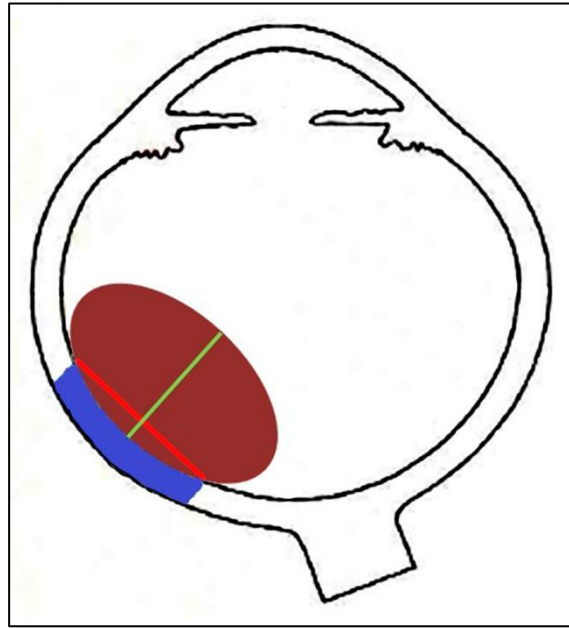


Figura 2. Determinación de los tamaños de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar (línea roja: longitud de la cuerda; línea verde: altura máxima; en azul: longitud del arco).

➤ Localización del tumor en el globo ocular:

- ❖ Cuadrante súperotemporal
- ❖ Cuadrante súperonasal
- ❖ Cuadrante ínferotemporal
- ❖ Cuadrante ínferonasal

➤ Localización del tumor en el tracto uveal:

- ❖ Coroides
- ❖ Cuerpo ciliar
- ❖ Iris

➤ Tratamiento y biopsias previas.

5.- ANTES DE SECCIONAR EL GLOBO OCULAR NOS PODEMOS AYUDAR DE DOS MÉTODOS PARA LOCALIZAR EL TUMOR:

- **Palpación:** Evaluamos la tensión de la superficie del globo ocular que es firme y localizada en casos de lesiones tumorales.
- **Transiluminación:** Aunque es el mejor método para localizar un tumor intraocular, se precisa una fuente de luz que se coloca adyacente a la córnea, en una habitación oscura.

6.- ANTES DE REALIZAR LA PRIMERA SECCIÓN DEL GLOBO OCULAR DEBEMOS *INCLUIR* PARA PREVENIR SU CONTAMINACIÓN POR EL TUMOR:

- Borde de resección del nervio óptico.
- Muestreo de las venas vorticosas (*Fig.3*):
 - ❖ Tunelizan la esclera en un ángulo oblicuo, localizándose aproximadamente a 6-8 mm del nervio óptico y se disponen en los cuatro cuadrantes del ojo a 45° de los planos vertical y horizontal (a las 2, 5, 7 y 10 horarias). Sin embargo, puede existir una variación considerable en el número y localización de las venas vorticosas.
 - ❖ Realizar un corte transversal en el punto de salida del canal escleral (a ras de la esclera) e incluirse longitudinalmente, si es posible, para ser cortadas a distintos niveles para maximizar la posibilidad de detectar invasión vascular por el tumor.
- Tejidos blandos perioculares: resto de vasos sanguíneos, músculos...

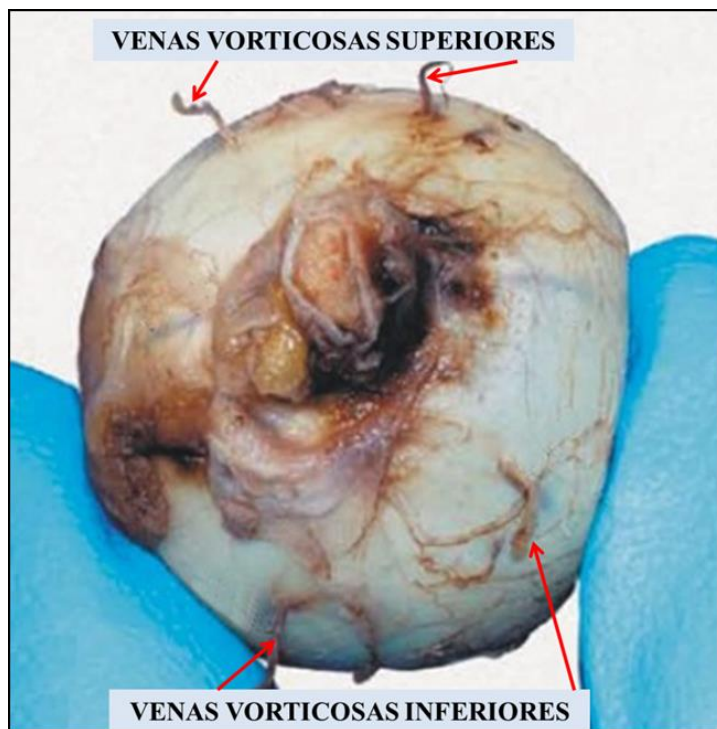


Figura 3. Venas vorticosas.

7.- SECCIÓN DEL GLOBO OCULAR:

- Se recomienda realizar el corte con una cuchilla de afeitar o cuchilla de micrótopo realizando un movimiento suave, cuidadoso evitando un movimiento de vaivén o de sierra.
- El plano de corte (vertical, horizontal u oblicuo) dependerá de los hallazgos del examen externo y localización del tumor determinado previamente mediante palpación o transiluminación. La idea es conseguir un corte anteroposterior central que incluya la localización principal del tumor junto con la pupila y el nervio óptico (*Fig.4*).
- Realizar fotografía de la lesión (*Fig.5*).

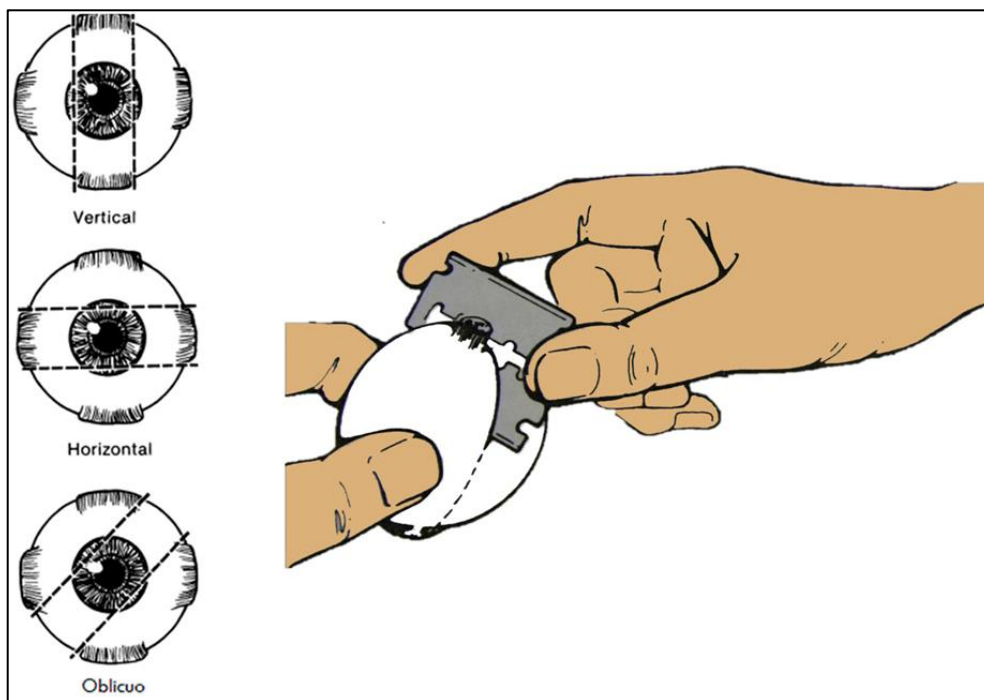


Figura.4. Planos de corte y primera sección del globo ocular.



Figura 5. Primera sección del globo ocular con melanoma de coroides.

- Proseguir con el segundo corte que debe ser paralelo al primero. Este corte es más difícil de realizar ya que la estabilidad de la pieza se pierde. Se recomienda colocar el ojo con el lado seccionado hacia una superficie plana para estabilizarlo durante este procedimiento y realizar este 2º corte desplazando la cuchilla en dirección posterior-anterior o desde un lado al otro (*Fig. 6*).

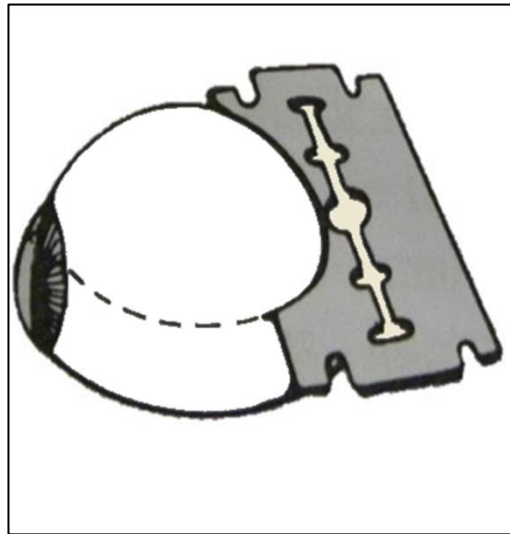


Figura 6. Segunda sección del globo ocular.

- El resto de cortes, hasta la seriación completa de la pieza se realizarán paralelos al primer corte.

8.- EXAMEN INTERNO DEL GLOBO OCULAR:

- Descripción del tumor:
 - ❖ Tamaño tumoral (*Fig. 7*):
 - ✓ Longitud de la cuerda (dimensión basal máxima)
 - ✓ Altura máxima
 - ✓ Longitud del arco (longitud máxima en contacto con la esclera).

- ❖ Localización en el tracto uveal: coroides, cuerpo ciliar e iris (*Fig. 7*). En aquellos casos en los que el tumor comprometa a varias partes o componentes del tracto uveal (iris-cuerpo ciliar, cuerpo ciliar-coroides o iris-cuerpo ciliar-coroides, es decir, en casos de melanoma iridociliar, ciliocoroideo o iridociliocoroideo) se puede considerar como localización inicial aquella que contenga más de las 2/3 partes de la masa tumoral o según otros autores la mitad de dicha masa.

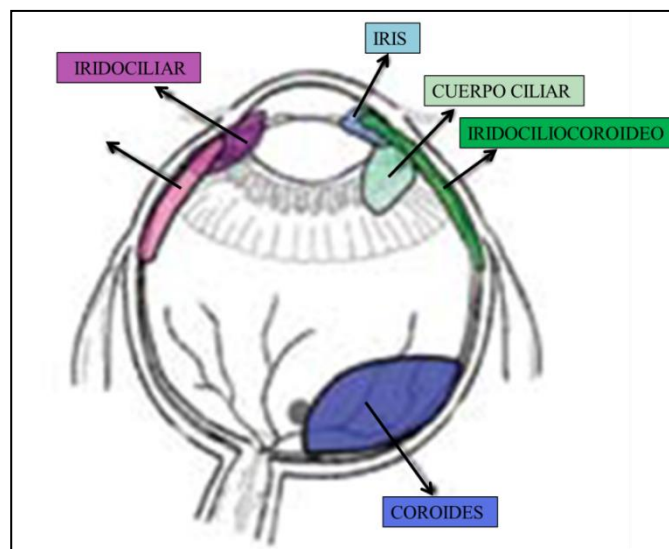


Figura 7. Localización del tumor en la úvea.

- ❖ Forma: discoide, cupuliforme, en forma de champiñón, bilobular, multilobular.
 - ❖ Consistencia
 - ❖ Grado y homogeneidad de la pigmentación
 - ❖ Localización en las cámaras oculares (*Fig.8*):
 - ✓ Cámara anterior
 - ✓ Cámara posterior
 - ✓ Cámara vítrea o compartimeto posterior
- } Conforman el compartimento anterior

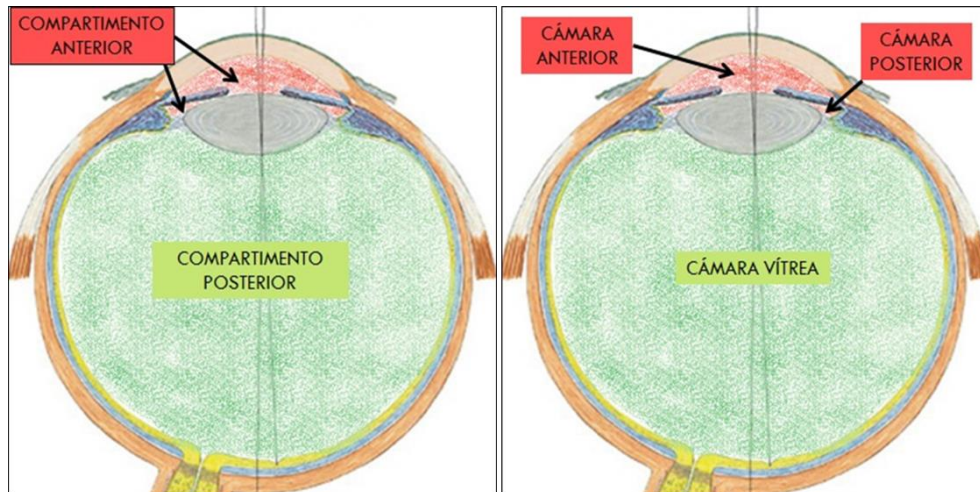


Figura 8. Compartimentos y cámaras del globo ocular.

❖ Posición respecto a estructuras o puntos anatómicos fijos:

- ✓ Distancia del margen posterior de la base tumoral a la papila o disco óptico.
- ✓ Distancia del margen anterior de la base tumoral al limbo esclerocorneal.

❖ Patrón de crecimiento tumoral (Fig.9):

- ✓ Focal: Masa sólida circunscrita.
- ✓ Difuso (plano): Afectación de al menos un cuarto de úvea observable en el plano de corte con patrón de crecimiento plano y altura que no exceda los 7 mm.
- ✓ Difuso en anillo: Afectación circunferencial de la úvea al menos 180° (6 o más horas de reloj) con patrón de crecimiento plano y altura que no exceda los 7 mm.

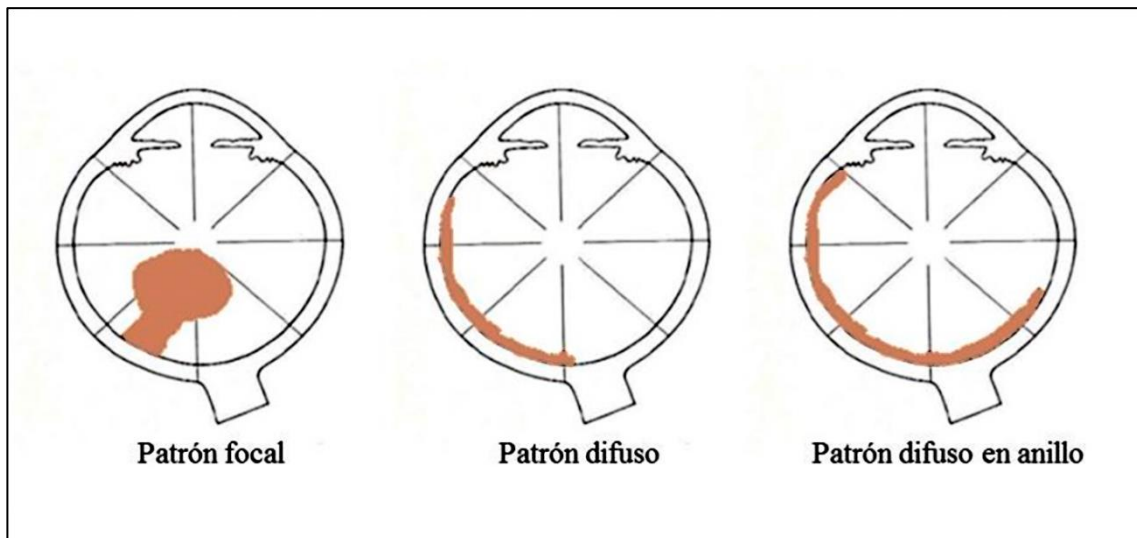


Figura 9. Patrones de crecimiento tumoral.

❖ Estructuras afectadas por el tumor:

- ✓ Cuerpo ciliar
- ✓ Coroides
- ✓ Iris
- ✓ Esclera
- ✓ Disco óptico
- ✓ Vítreo
- ✓ Cristalino
- ✓ Ángulo iridocorneal (el ángulo abierto normal es de 45°).
- ✓ Nervio óptico
- ✓ Retina
- ✓ Córnea

❖ Presencia de hemorragia o necrosis.

ANEXO 3

PROTOCOLO DE BLANQUEAMIENTO DE MELANINA PARA EL RECuento DE MITOSIS EN TUMORES PIGMENTADOS	
1º	Desparafinar los cortes histológicos: Introducir en estufa a 60°C durante 20-30 minutos y sumergir en 2 baños sucesivos de xilol durante 15 y 5 minutos respectivamente
2º	Hidratar los cortes histológicos en baños decrecientes de alcohol: <ul style="list-style-type: none"> • Alcohol 100° (10 pasadas) • Alcohol 95° (10 pasadas) • Alcohol 80° (10 pasadas) • Alcohol 70° (10 pasadas)
3º	Lavar en agua corriente durante 5 minutos y 3 pases en agua destilada
4º	Incubar los cortes histológicos en H ₂ O ₂ diluida al 10% con tampón fosfato (PB) durante 18 horas a temperatura ambiente
5º	Lavar en agua corriente durante 5 minutos y 3 pases en agua destilada
6º	Teñir con HE